

生命科学实验指南系列



Biological Aging
Methods and Protocols

生物衰老：研究方法与实验方案

〔美〕托尔夫波 T. O. 等 著
王 钊 于皓月 王卓然 译


科 学 出 版 社

生命科学实验指南系列·典藏版

生物衰老:研究方法与实验方案

Biological Aging: Methods and Protocols

〔美〕托尔夫波 T. O. 等 著

王 钊 于皓月 王卓然 译

科 学 出 版 社

北 京

图字：01-2012-3446 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

致　谢

本书的翻译工作得到国家重点基础研究发展计划(“973”计划)
给予的基金支持
No. 2007CB507406

特此向首席科学家陈香美院士和各位专家的关心和帮助表示衷心的感谢

序

2011 年进行的我国第六次人口普查数据显示，中国人口老龄化加速，65 岁及以上人口的比例上升 1.91 个百分点，国家将面临未富先老的困境。因此，有关老龄化和衰老的研究已经是刻不容缓。随着社会发展和生活模式与健康模式的转变，世界范围的衰老研究如火如荼。作为衰老机理最重要的理论之一的端粒酶的发现者，三位美国科学家在 2009 年获得了诺贝尔生理学或医学奖，引起了世界医学与健康研究领域的关注。我国有世界上最为庞大的老年人群；56 个民族提供了丰富的遗传基因资源；辽阔的国土促成了生活环境、生活方式和生活习惯的巨大差异。这些为从整体、细胞及基因水平研究衰老提供了得天独厚的条件。此外，我国特有的中医理论和中草药资源，也为探索天然化合物干预衰老的机制提供了宝贵经验，蕴藏着突破的潜能。从 2000 年开始，国家科技部先后两次启动了关于衰老研究的国家重点基础研究发展计划（"973"计划）项目，但中国至今尚无类似美国国立卫生研究院下设的专门研究衰老的国立衰老研究所（NIA）那样的科研机构，对衰老机制和延缓衰老等方面的研究也还处在一个探索和发展的阶段。

作为国家重点基础研究发展计划项目《衰老的机制与干预的基础研究》（2007CB507400）课题的承担者，清华大学医学院的王钊教授及其团队在项目组的指导和帮助下，在衰老和相关疾病及其药物干预的研究领域深入研究、努力探索，做出了很好的成绩和贡献。他们在研究和工作中努力汲取世界最先进的方法和技术，积累了大量的技术方案和丰富的科研经验。此次，他们在取得版权后翻译出版了该领域非常著名的实验技术指导《生物衰老：研究方法与实验方案》（Trygve O. Tollefsbol 著，Humana 出版社）一书，是我国衰老研究领域的一件喜事。该书不仅提供了衰老研究领域一些成熟可靠的技术方法，同时介绍了一些在该领域的最新技术突破，囊括了衰老研究领域主要的技术操作和实验方案，如衰老机制的研究、干预衰老的技术，以及衰老过程的分析方法等。这些内容将为我国衰老研究的深入发展和领域推动做出重要的贡献。

特此志序。

中国工程院院士

"973"计划衰老项目首席科学家

2012 年春　于北京

前　　言

生物学衰老是一个多元化的话题，一方面，机体的衰老影响许多过程，这些过程不仅体现在正常的生理和分子的变化中，还体现在癌症、糖尿病、阿尔茨海默病、骨质疏松等一系列增龄相关疾病中。另一方面，衰老这一话题包罗万象，因而出现了许多分析和研究衰老的新工具，特别是在过去的十年中。因此本书，即《生物衰老：研究方法与实验方案》不仅提供若干成熟的技术，还将介绍最近在这一领域最令人兴奋的技术突破，它们将衰老的研究推到了生命科学的前沿。

在一册书中涵盖应用在生物学衰老研究中的所有方法是不现实的。相反，作为《分子生物学方法》系列之一，本册重点讨论生物学衰老研究中重要的，或者是有希望给这一相对新的学科带来突破性革新的话题。本书涉及的主要领域包括大多数生物学衰老研究中的重点：①理解细胞衰老基本机制的基本方法；②干预衰老过程的技术；③分析生物学衰老中分子过程的方法。生物学衰老的基本方面、干预以及分析中的一般方法将在几个章节中专门讨论。

本书的目的是介绍当今生物学衰老研究中使用的最有前途、最重要的工具，包括衰老细胞培养等成熟的方法，以及核移植、微阵列和蛋白质组学技术、在衰老研究中使用核酶等先端的方法。总体来说，这些强大的工具与许多其他技术相结合，迅速地推进了生物学衰老这一令人兴奋并不断扩大的研究领域的发展。

Trygve O. Tollefsbol

原作者及其单位

LUCY G. ANDREWS • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
SERGEY V. ANISIMOV • *Neuronal Survival Unit, Wallenberg Neuroscience Center, Lund University, Lund, Sweden*
VLADIMIR N. ANISIMOV • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*
STEPHEN BARNES • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
JOEL B. BERLETCH • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
MARIA A. BLASCO • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*
RITA A. BUSUTTIL • *Buck Institute for Age Research, Novato, CA*
KERRY BYNUM • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
CARLOS CABRERA • *University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX*
JUDITH CAMPISI • *Life Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA*
ANDRES CANELA • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*
CUIYING CHEN • *Department for Molecular Biomedical Research, Ghent University and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent, Belgium*
JIAN-HUA CHEN • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*
RONALD CONTRERAS • *Department for Molecular Biomedical Research, Ghent University and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology (VIB), Ghent, Belgium*
XIANGQIN CUI • *Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
MARIA DE LUCA • *Department of Nutrition Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
CUSTER C. DEOCARIS • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*

JESSY DESHANE • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
GOBERDHAN P. DIMRI • *Division of Cancer Biology, Department of Medicine, ENH Research Institute, and Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Evanston, IL*
MARTIJN E. T. DOLLÉ • *National Institute of Public Health and Environment, Bilthoven, The Netherlands*
SHANNON ELIUK • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
PAOLA FABRIZIO • *Andrus Gerontology Center, Division of Biogerontology and Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA*
ANA MARIA GARCIA • *University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX*
MARK D. GARFINKEL • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
SHIMON GEPSTEIN • *Faculty of Biology, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
C. NICHOLAS HALES • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*
HUI-CHEN HSU • *Department of Medicine, Division of Clinical Immunology and Rheumatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
DONALD K. INGRAM • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*
KOJI ITAHANA • *Department of Radiation Oncology, School of Medicine, The University of North Carolina, Chapel Hill, NC*
RIMA KADDURAH-DAOUK • *Duke University Medical Center, Department of Psychiatry, Durham, NC*
MO K. KANG • *School of Dentistry, David Geffen School of Medicine, and Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, CA*
SUNIL C. KAUL • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*
DAVID L. KEEFE • *Department of Obstetrics and Gynecology, Women & Infants Hospital, Brown Medical School, Providence, RI*
HELEN KIM • *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
NAM CHUL KIM • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

MARION KIRK • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

PETER KLATT • *Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain*

BRUCE S. KRISTAL • *Dementia Research Service, Burke Medical Research Institute, White Plains and Department of Neuroscienc, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY*

MARK A. LANE • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*

JEFF LEIPS • *Department of Biological Sciences, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, MD*

LIN LIU • *Department of Obstetrics and Gynecology, Women & Infants Hospital, Brown Medical School, Providence, RI*

VALTER D. LONGO • *Andrus Gerontology Center, Division of Biogerontology and Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA*

ANN LORAINE • *Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

LU LU • *Center for Neuroscience and Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis, TN*

XIANGYI LU • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

MARTHA LUNDELL • *University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX*

WAYNE R. MATSON • *Department of Systems Biochemistry Bedford VAMC, Bedford, MA*

OLIVER MEDVEDIK • *Pharmacology Department, Harvard Medical School, Boston, MA*

SREELATHA MELETH • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

JOHN D. MOUNTZ • *Department of Medicine, Division of Clinical Immunology and Rheumatology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

HIROSHI NAKAGAWA • *Gastroenterology Division, Department of Medicine and Abramson Cancer Center, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA*

OLIVER G. OPTIZ • *Department of Medicine and Institute for Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, Freiburg, Germany*

SUSAN E. OZANNE • *Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, United Kingdom*

NO-HEE PARK • *School of Dentistry, David Geffen School of Medicine, and Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, CA*
JOAO F. PASSOS • *Henry Wellcome Laboratory for Biogerontology Research, Newcastle University, Newcastle, UK*
SHARLA M. O. PHIPPS • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
ANITA PINNER • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
IRINA G. POPOVICH • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*
GLORIA ROBINSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
ARMANDO RODRIGUEZ • *University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, TX*
GEORGE S. ROTH • *Laboratory of Experimental Gerontology, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD*
DOUGLAS M. RUDEN • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
TODD SANDERSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
YEVGENIYA I. SHURUBOR • *Dementia Research Service, Burke Medical Research Institute, White Plains, NY*
DAVID A. SINCLAIR • *Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA*
MICHAL B. STERNBERG • *Faculty of Biology, Technion, Israel Institute of Technology, Haifa, Israel*
TRYGVE O. TOLLEFSBOL • *Department of Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
GARY VAN ZANT • *Department of Internal Medicine, Markey Cancer Center, University of Kentucky, Lexington, KY*
JAN VIJG • *Buck Institute for Age Research, Novato, CA*
THOMAS VON ZGLINICKI • *Henry Wellcome Laboratory for Biogerontology Research, Newcastle University, Newcastle, UK*
RENU WADHWA • *National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Tsukuba Science City, Japan*
SABRINA L. WALTHALL • *Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*

GREGORY WHITE • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
ROBERT W. WILLIAMS • *Center for Neuroscience and Department of Anatomy and Neurobiology, University of Tennessee, Memphis, TN*
LANDON WILSON • *UAB Comprehensive Cancer Center Proteomics/Mass Spectrometry Shared Facility, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
JIATAO YE • *Department of Environmental Health Sciences, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
NENGJUN YI • *Section of Statistical Genetics, Department of Biostatistics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL*
MARK A. ZABEZHINSKI • *Department of Carcinogenesis and Oncogerontology, N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russia*

目　　录

第1章　生物学衰老的研究技术

Techniques for Analysis of Biological Aging

Trygve O. Tollefsbol

摘要　衰老过程包括在分子、细胞及机体水平的变化，可用多种方法分析。数十年来，研究生物学衰老的一种普遍模式是分析呈现细胞衰老的离体培养细胞。最近，人们也将兴趣集中在了包括机体在内的衰老模型上，如酵母和果蝇的衰老。研究生物学衰老的技术在过去的十年间呈几何级数增长。研究生物学衰老的手段种类繁多，但可以大致归类为：①基本技术；②干预方法；③分析衰老细胞中呈现的分子及细胞水平变化的方法。因此，本书讨论的话题归类在这三个范畴中。

关键词　衰老；生物学；方法；技术；分析；生物老年学

1.1　引言

影响衰老的过程多种多样，这使得对生物学衰老研究方法的整理汇编成为一项令人望而生畏的工作。20世纪60年代早期，Leonard Hayflick 揭示了离体培养细胞的寿命有限，这一过程通常称作细胞衰老（*1*），这是衰老研究中的一个重大突破。很多改变，如端粒缩短、氧化应激、DNA损伤以及原癌基因的激活，都可以导致细胞衰老。细胞在这些过程中经历了一系列形态和代谢上的改变并最终停止分裂（*2*）。尽管无数分子过程与生物学衰老相关联，但最主要的分子水平的异常与基因组的不稳定性、遗传程序以及活性氧这三者相关。其中，引起与年龄相关的基因组不稳定性的一个主要因素是端粒的缩短。端粒缩短的原因是维持端粒长度的端粒酶在绝大多数体细胞内表达水平非常低（*3*）。细胞在接受外源端粒酶后可以保持年轻状态并无限增殖，这一发现为端粒酶在细胞衰老过程中所扮演的重要角色提供了强有力的支持和证明（*4*）。遗传程序对生物学衰老的作用已被诸多研究所证实。例如，以 *daf* 和 *age-1* 基因为代表的一些基因突变后可以延缓生物学衰老（*5*）。活性氧是代谢过程中所产生的自由基，它们会引发多种分子的积累性损伤从而促进衰老（*6*）。衰老过程中，无疑也会发生许多其他方面的改变，而新的生物学衰老分析技术的不断发展和完善将大幅推动我们对这些促进衰老和决定寿命的过程的认识。

1.2 本书的主要内容

1.2.1 研究衰老过程的基本方法

随着连续培养细胞直至其衰老的技术的发展，生物老年学获得了重大进展。这项技术在 20 世纪 60 年代首次使用，为生物学衰老的研究带来了深刻的变革。本书第 2 章将详细介绍正常人二倍体成纤维细胞培养和传代的实验方案。当然，这种方法体系仅仅是一种模拟衰老过程的近似手段，因为细胞衰老与生物学衰老之间是否有直接关联仍是备受争议的话题。尽管如此，通过这些方法我们可以清楚地了解大量导致衰老的分子机制与过程。细胞衰老研究中的重要进步是可靠的生物标记技术，即衰老相关的 β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）检测。这种方法包括应用底物半乳糖苷（X-gal）对细胞进行组织化学染色，以区分衰老细胞和休眠细胞，这是评价生物学衰老的一个重要的决定性指标（见第 3 章）。SA-β-gal 技术能准确可靠地区分衰老和未衰老的细胞。这项技术现正被广泛应用于生物学衰老研究当中，部分原因在于其易于检测。另一项鉴别衰老细胞的方法将在第 4 章详细介绍，该方法通过流式细胞技术分选细胞，其原理是从物理特征上区分年轻和年老细胞。在衰老相关的转录调控区域构建表达绿色荧光蛋白（GFP）的报告基因，能够定量获得衰老与未衰老细胞的出现频率。尽管插入逆转录的报告基因会出现不均一性，但这种方法被证明能够有效区分年轻与年老细胞，在细胞衰老研究中具有诸多明显的优势。

端粒缩短被指出是衰老相关的主要过程，第 5 章将叙述 3 种常用的分析端粒长度的方法：①端粒限制性片段（TRF）分析；②定量荧光原位杂交（Q-FISH）；③流式荧光原位杂交（flow-FISH）。虽然应用 TRF 分析端粒长度多年来已成为衰老研究中的支柱技术，但这项技术的一系列缺点也促使 Q-FISH、Flow-FISH 以及其他更多在衰老体系中测定端粒长度的新型方法迅速发展起来。表观遗传学过程某种程度上由 DNA 甲基转移酶介导，在衰老过程中该酶也扮演了很重要的角色。这一过程已被在衰老细胞和衰老组织中发生的显著的基因组低甲基化现象所证实（**7**）。DNA 甲基转移酶-1（DNMT-1）是哺乳动物细胞中主要的 DNA 甲基转移酶，我们将在第 6 章中介绍一种检测和评估其在衰老细胞中转录水平的综合方法。第 7 章将讨论一项相关技术，从而详细说明 DNA 甲基转移酶在处于衰老进程当中的细胞内的蛋白质表达特点。

很多有关衰老的基础层面的研究依靠酵母模型，第 8 章介绍的酵母寿命研究已成功地与若干调控衰老过程的关键途径相配合。其中运用正常组和热量限制组，介绍了确定单细胞酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）寿命的一些方法。尽管生物学衰老研究中也运用另外的一些基本方法，但第 2～8 章叙述的内容足以为检测细胞衰老提供基本的工具和方法，并促进我们更加深入地在细胞生物学、遗传学及分子生物学层面研究生物学衰老。

1.2.2 干预衰老过程的技术

除了分析生物学衰老的基本方法以外，许多新近发展起来的干预衰老过程的技术能

够确定调控和介导生物学衰老的主要因素。热量限制大概是被广泛接受的调节寿命的方法，第9章将讲述它在酿酒酵母（*S. cerevisiae*）上的应用。其中将详细介绍确定单细胞酵母复制寿命的方法，以及测量 rDNA 基因座的重组频率和染色体外 rDNA 环的产生的方法，而 rDNA 环是酵母模型衰老的首要原因。果蝇属（*Drosophila*）是另一个研究年龄相关变化的常用模型，第10章叙述了营养遗传学技术，可用于分析被控制饮食的果蝇幼虫和果蝇成虫［给予高水平棕榈酸（一种饱和脂肪）、大豆或95%瘦牛肉］。这种方法与微阵列分析相结合，可以确定衰老果蝇体内饮食相关 mRNA 表达的改变情况。第11章是对衰老研究中热量模拟方法应用的综述。热量限制在正常饮食摄入量的60%～70%时，对延迟动物模型年龄相关效应有一定作用，应用于人类并不现实，因此需要替代的方法。热量限制模拟的目标是改变产能相关的代谢途径，以期在不显著减少食物摄入的情况下获得热量限制的效果。其中分析了糖酵解抑制剂、抗氧化剂和特异性基因调控子作为热量限制模拟的应用。

第12章叙述了一种完全不同的干预衰老过程的方法，它建立在端粒酶对生物学衰老的重要作用的基础上。端粒在端粒酶的催化亚基 hTERT 过度表达时可被重新构建，经常导致细胞的无限增殖或复制寿命的延长。在过去的十年中，这些方法广泛用于阐明无限增殖的分子基础，从而揭示可能限制衰老细胞复制的相关机理。hTERT 在组织工程领域中可能也有重要应用。既然我们可以通过致癌物质探究肿瘤的发生，那么我们也能够通过加速细胞衰老来了解细胞的衰老过程。例如，第13章描述了如何引入确定的遗传因素，如端粒酶的显性负版，重现细胞衰老过程。其中也描述了通过过表达癌基因 *ras* 和 *p16* 诱导细胞过早衰老的技术。此外，其他多种技术也可以诱导细胞过早衰老，如使用过氧化氢引发氧化应激，这将在第14章讲述。

由于细胞核包含衰老过程的基本“蓝图”，核移植技术在干预衰老过程的研究中具有广泛的潜力。第15章描述了处于生发泡阶段和原核阶段受精卵的核移植方法。核酶的应用代表了干预衰老过程的另一种途径，这将在第16章介绍。正常和杂交锤头状核酶的结构也会在这一章叙述，因为这种基因敲除实验会影响衰老过程，并且揭示出调控细胞衰老的关键基因（***8***）。该部分描述的一种随机方法有很高的灵活性，且没有酶依赖性，不需要预先知道靶序列并具有高度特异性。抗衰老药物的开发也对干预衰老有重要意义，第17章将从药理学角度出发，评价药物对小鼠衰老和寿命的影响。归根结底，在一定程度上控制生物学衰老是诸多生物老年学研究的目标，而本书第9～17章提供了很多目前最为可靠且有效的调控细胞衰老和寿命的方法。

1.2.3 分析生物学衰老的实验方案

除了调节衰老过程的基本生物学工具和方法外，分析在衰老过程中发生的很多分子和细胞变化的技术也相当重要。一种用于酿酒酵母的高通量功能基因组筛选系统（详见第18章）可以鉴别很多能够延长寿命的基因。在这种衰老的模式系统中，母细胞随着年龄增长会在细胞表面积累芽痕，芽痕中含有高水平的甲壳素。甲壳素可以被小麦胚芽凝集素染色，从而能够应用基于芽痕的流式细胞分选系统测定酵母寿命的变化。微阵列技术的重大进步促进了其在生物老年学中的应用。第19章将介绍两种不同的方案，分

别应用寡核苷酸和 cDNA 微阵列平台。放射性和非放射性（荧光）的方法均可使用，而且这些方法都被证明是强大的高通量基因分析工具，能提供传统生物学衰老研究方法无法获取的有价值的数据。体细胞突变多年来被认为与衰老过程相关，目前的方法能够更广泛地检测衰老细胞突变（详见第 20 章）。例如，一种基于将含有 *lacZ* 的质粒整合入，如小鼠（*Mus musculus*）或果蝇（*Drosophila melanogaster*）等模式系统的种系中的突变报告系统，可以鉴别 *lacZ* 突变基因并能够恢复。接着可以表征目的基因，并建立对衰老体系中积累的突变的详细分析。第 21 章将描述通过消减杂交技术检测衰老中差异表达基因的方法。这个方法的强大之处在于它使研究者可以比较两个 mRNA 群体并鉴定差异性表达的基因，并可用于处于不同衰老水平的细胞。

为了检测自然产生的造成寿命差异的分子多态性，在连锁不平衡基因定位后可以获取其数量性状基因的图谱（详见第 22 章）。连锁不平衡基因定位从自然种群大量样本的等位基因中采集，可得全基因组重组基因定位，以鉴别影响寿命的数量性状基因所在的数量性状位点（quantitative trait loci，QTL）。这一过程应用在果蝇模式系统中，运用定量互补实验和连锁不平衡基因定位鉴别决定寿命差异的遗传多态性。QTL 分析也可应用于哺乳动物系统的衰老研究中（详见第 23 章）。重组近交系小鼠可用于定位与衰老相关过程（如胸腺的退化）有关联的基因位点。这种方法包括对目标表型及年龄相关表型变化的鉴别，分析和确定与表型相关的 QTL，以及确定位点的遗传作用。本书介绍的特定技术除用于检测小鼠衰老伴随的胸腺退化，亦可用于测定各个年龄重组近交系小鼠中具有遗传差异性的任意数量性状。

当然，蛋白质分析在生物老年学中也占有很重要的地位，第 24 章将介绍应用二维（2D）凝胶蛋白质组学研究衰老样本年龄相关的蛋白质丰度和亚型复杂性变化的方案。其中详细描述了很多种实验方案，包括等电聚焦法、十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）、Sypro Ruby 荧光蛋白染料凝胶染色法、二维凝胶图像分析、使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）和液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）分析肽质谱指纹图、Western 印迹法分析蛋白质氧化以及质谱定位蛋白质氧化位点。这些方法对于研究生物学衰老有非常重要的作用，因为氧化应激和蛋白质相互作用的改变在细胞衰老和衰老相关的疾病中经常发生。最后，第 25 章描述了衰老和热量限制系统中的代谢组学分析方法。用到的技术包括高效液相色谱（HPLC）分离与库伦电极阵列检测偶联，可以综合分析衰老样本（如血清或血浆）中小分子的变化。这一系统的优点在于其精确定量和高灵敏度，缺点是放大能力不足、对衰老系统中发生改变的代谢产物的结构分析不足等。这项技术可能会用在衰老和热量限制研究的很多领域，如分类、生成假设、确定机制及临床实践。因此，第 18～25 章中提供了多种分析生物学衰老过程中分子改变的方法，可应用于从酵母到人类血浆等模式系统。

1.3 结论

本书提供用于检测生物学衰老相关变化的最新的以及更加成熟的技术。实验方案涵盖基础领域，如细胞培养和端粒分析，以及干预衰老过程的方法，如引发氧化应激或进

行热量限制，还有 QTL、蛋白质组学、代谢组学等分析衰老系统中多种分子变化的途径。许多研究者都不会将他们的研究限定于一种技术，而是将其中一些方法相结合。只有建立在现存手段上的新方法才能推动生物学衰老研究持续高速进展。本书旨在提供诸多最为实用、适宜且高效的技术，用于研究调控生物学衰老以及诸多生物学衰老影响的过程。

参考文献

1. Hayflick, L. and Morehead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621.
2. Ben-Porath, I. and Weinberg, R. A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 961-976.
3. Ahmed, A. and Tollefsbol, T. O. (2001) Telomeres and telomerase: basic science implications for aging. *J. Am. Geriatric Soc.* **49**, 1105-1109.
4. Bodnar, A. G., Quellette, M., Frolkis, M., et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
5. Kenyon, C. (1996) Pounce d'elegans: genetic quest for the fountain of youth. *Cell* **84**, 501-504.
6. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003) Oxygen sensitivity severly limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5**, 741-747.
7. Liu, L., Wylie, R. C., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2003) Aging, cancer and nutrition: the DNA methylation connection. *Mech. Ageing Devel.* **124**, 989-998.
8. Deocaris, C. C., Kaul, S. C., Taira, K., and Wadhwa, R. (2004) Emerging technologies: trendy RNA tools for aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59**, 771-783.

第2章　衰老细胞培养：方法与观察

Aging Cell Culture: Methods and Observations

Sharla M. O. Phipps，Joel B. Berletch，Lucy G. Andrews，Trygve O. Tollefsbol

摘要　正常人二倍体成纤维细胞的培养和传代提升了我们对于老化中涉及的分子事件的认知。这一进步促进了针对增龄相关生理病理变化的治疗手段不断发展，它们可以延缓或逆转衰老过程。人们已证实正常人的二倍体成纤维细胞培养时只能在一段有限的时间内分裂增殖。Hayflick 和 Moorhead 以及一些其他的研究人员已经论证了从胎儿到成年人的很多种类型的细胞都无法无限增殖。在体外研究老化过程的方法很多，本章将总结一些实验室常用的操作方案。

关键词　衰老；老化；生物标志物；成纤维细胞；细胞培养

2.1　引言

连续培养的正常体细胞是一种研究得较为成熟的模型系统，用于模拟发育和衰老相关的细胞和分子变化。衰老是一个复杂的过程，可能由环境刺激和内在程序两部分构成。细胞培养体系可以很好地模拟显示衰老相关变化过程中细胞增殖调控机制的模型。有趣的是，人们注意到两种主要的衰老相关疾病——癌症和动脉粥样硬化，均显示出细胞增殖调控障碍。Rubin（*1*）提出："复制寿命有限是由于细胞不能适应外植带来的损伤以及细胞培养的外来条件"。同时，Rubin 还提出疑问："体内正常体细胞的平均寿命是否也只是分裂 50 次左右？"由放射性标记小鼠细胞获得数据并将其同人类 70 岁的寿命相比较推测，人体细胞在一生中可以分裂 500～5000 次（具体次数取决于细胞类型）。这些数值与体外观察到的 20～70 的群体倍增数之间存在着极大的差异（**参考文献 *1*** 综述）。

针对预防和治疗随年龄增长而产生的疾病，我们获得了很多治疗策略方面的相关信息。很多研究集中在增大发病率和死亡率的特定的衰老相关问题上，因为老化本身在体外培养的条件下更加难以定位和模拟（***2***）。为了这一目标，研究手段将关注点集中在带来不利后果的衰老相关变化上，或者集中在引起很多衰老相关的功能异常的过程上（***3***）。但产生的问题是，这些研究是否能够准确表现机体内真正发生的变化。细胞培养要求细胞连续进行分裂增殖，这在机体内不会发生，并会对细胞产生非自然的应激（***4***）。另外，体外培养的细胞与完整机体内的细胞在代谢需求、生长条件等方面都截然不同。常规的 10 倍稀释的血清培养基中的蛋白质浓度低于正常细胞外组织液（***1***）。为

了强调“体外培养细胞的需要与完整组织中的细胞不同”这一论点，Rubin 引用了“新分离出的细胞的稳定生长需要 13 种氨基酸，而机体中的细胞只需 8～10 种”的研究结论。很多细胞如果不以一个相对高的种群密度接种就无法增殖，条件培养基对增殖能力的巨大影响（尤其是对少量细胞）更加说明了这一事实（**5**）。

在体外培养的体细胞中观察到的有限的生长能力已经被认为是“在体外由人造环境引起的人为的遗传损伤”，然而具有无限增殖能力的正常人体细胞群尚未有报道。此外，基于自发无限增殖现象极低的发生率，人体细胞的增殖潜力确实可能被内在限制了。尽管人们将连续培养中细胞生长能力的下降与导致老化联系起来，但并没有证据显示人类衰老与体细胞丧失分裂能力有何联系（**参考文献 *6*** 综述）。另外，现有研究无法一致地将端粒长度缩减、溶酶体酶功能增强（β-半乳糖苷酶染色）以及细胞周期的相关基因与衰老相关联，因为衰老更多表现为一个可逆的、长期的有丝分裂后的状态。酵母利用重组，果蝇利用特异性的逆转录转座子来延长染色体末端的长度（**7**）。只要把握观察到的现象和整个机体的生理之间的正确关系，体细胞有限的增殖能力似乎是一种研究人类衰老的合适的系统。培养体系表现出响应机体永久改变的渐进的阶梯式变化，而不是一些离散的阶段，如可以反映时间进程从配子融合到机体死亡的连续事件。

2.2　培养衰老的成纤维细胞

2.2.1　培养衰老成纤维细胞的步骤

1. 材料

以下材料是为在培养皿或培养瓶中单层培养哺乳动物细胞所准备的。操作中必须始终保持无菌，所有的培养工作都要在超净台中进行。尽管通常向培养基中添加抗菌剂以防止污染，但这不是不可或缺的。事实上，抗菌剂的长时间使用会引起细胞系的耐药性或导致细胞霉性。另外，某些抗菌剂不可以同时使用。对于大多数衰老细胞而言，培养基中加入终浓度 1%的链霉素、两性霉素 B 和青霉素的抗菌溶液（Mediatech，Inc.，http://www.cellgro.com）就可以充分抑制细菌、真菌和酵母的生长。所有孵育和长期培养都必须在湿润的 37℃、5% CO_2 培养箱中进行。培养基、胰蛋白酶/EDTA 溶液和磷酸盐缓冲液（PBS）在使用前应 37℃水浴预热。细胞的生长和传代培养要使用合适的培养基（一般细胞类型的培养基组分见**表 2.1**）。

（1）单层培养的细胞。

（2）胰蛋白酶/EDTA 溶液（**注释 1**）。

（3）加入血清的完全培养基（**表 2.1**）。

（4）无菌的巴斯德移液管。

（5）70%（m/V）乙醇。

（6）不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的无菌 PBS。

（7）组织培养的塑料器具（移液管、培养瓶、平板、冻存管、15 mL 和 50 mL 的锥形管），均要求无菌。

表 2.1　一般细胞类型的培养基组分

细胞系	基础培养基	补充	血清
MRC-5，WI-38，IMR-90 胎牛肺成纤维细胞，BJ 包皮成纤维细胞	Minimum Essential Medium (MEM) Eagle + Earle's Basic Salt Solution (BSS)	2×浓度的必需和非必需氨基酸和维生素，2 mmol/L L-谷氨酰胺，1.5 g/L 碳酸氢钠，1.0 mmol/L 丙酮酸钠	15% FBS，未灭活
CCL-39 中国仓鼠肺成纤维细胞	McCoy's 5a		10% FBS
A9 L 鼠成纤维细胞	Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	4 mmol/L L-谷氨酰胺，1.5 g/L 碳酸氢钠，4.5 g/L 葡萄糖	10% FBS
C2C12 鼠成肌细胞	Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM)	4 mmol/L L-谷氨酰胺，1.5 g/L 碳酸氢钠，4.5 g/L 葡萄糖	10% FBS（或 10% 马血清以加强肌管的形成）
RBL-2H3 大鼠嗜碱性粒细胞白血病	Minimum Essential Medium (MEM) Eagle + Earle's Basic Salt Solution (BSS)	2 mmol/L L-谷氨酰胺，1.5 g/L 碳酸氢钠，0.1 mmol/L 非必需氨基酸，1.0 mmol/L 丙酮酸钠	15% FBS，加热灭活

2. 方法

冻存细胞的解冻和复苏，胰蛋白酶消化和单层细胞的传代培养，以及单层细胞冻存的方法如下所述。

1）解冻和复苏

（1）从液氮中取出冻存管，置于 37℃水浴中，轻轻搅动至融化。

（2）用 70%的乙醇擦拭冻存管，然后放入超净台中并打开。

（3）将细胞转移到装有 37℃培养基的 15 mL 锥形管，150～200 *g*（使用浮桶式转头或固定角转头，约为 1000 r/min）离心 5～10 min（大约每分钟 1000 转，固定角转头 45°）。去除含有残留的二甲基亚砜（DMSO）的上清液。

（4）用 1 mL 完全培养基重悬沉淀，转移到装有适量培养基的培养皿或培养瓶中。置于培养箱中，24 h 后检查细胞的贴壁情况。

2）胰酶消化和传代培养

细胞的传代培养应该在约 90%贴壁的情况下进行，以避免接触抑制或发生转化。

（1）用无菌巴斯德移液管吸弃原代培养中的培养基。用少量无菌 PBS 洗涤贴壁细胞以除去残留的胎牛血清（FBS），FBS 可以抑制胰蛋白酶。

（2）加入足以覆盖单层细胞的 37℃的胰蛋白酶/EDTA 溶液（**注释 1**）。置于培养箱中 1～2 min（**注释 2**）。用倒置显微镜检查细胞，以确定细胞相互分离。

(3) 加入适量（2～6 mL）预热的培养基，轻轻地上下吹吸使细胞分散开。

(4) 分装细胞悬液至新的培养器皿。

(5) 培养细胞，24 h 后检查贴壁情况。

(6) 每 2～4 天更换培养基。

3）冻存

冻存时使用的细胞应处于对数生长期的后期。

(1) 用胰蛋白酶/EDTA 溶液（**注释 1**）将单层细胞分散开，在完全培养基中重悬细胞。

(2) 对重悬后的细胞计数，以确定其活力和数目（**注释 3**）。

(3) 温和地离心细胞，速度 300～350 *g*（使用浮桶式转头或固定角转头，1500 r/min），弃上清液。

(4) 使用冷冻保存培养基重悬细胞（**注释 4**），浓度大约为 5×10^6 个细胞/mL。分装细胞悬液至标记好的冻存管中，立即冷冻。

(5) 细胞可以短期保存在－80℃（可选择将冷冻管放入泡沫聚苯乙烯容器中，或使用慢速冷冻器，如装有异丙醇的 NALGENE® 冻存容器，它可以以每分钟降温 1℃的速度冷冻样品，以防止形成导致细胞损伤的冰晶）。

(6) 24 h 后将冷冻管转移至液氮（－196℃）中长期保存。

2.2.2　衰老细胞培养：主要问题和实验的注意事项

1. 复制衰老和体内衰老的关系

衰老研究中的一个主要的问题就是我们在复制衰老中观察到的变化是否与体内原位衰老细胞的途径和机制一致。支持复制衰老与原位体细胞衰老有直接关系的证据来自培养的皮肤成纤维细胞的复制寿命会因供体增龄而缩短（***9～11***）。然而，并没有一致的研究结果可以证实供体年龄和复制寿命之间存在反向关系，这是确定细胞培养模型与整个机体老化之间关系时的问题所在（***9***）。

有关复制衰老，争论的一个主要来源就是许多作者都通过调控特定的途径和细胞培养条件引起衰老表型（**参考文献 *12* 综述**），这说明衰老表型的显现可以不经历增殖。这一证据说明衰老表型是活跃分裂细胞在信号转导或代谢失衡时的共同的最终途径。由此可以得出结论：由于培养基中会丢失一些信号或无法处理这些信号，细胞可能无法达到它们在体内的真正不同去向（***12***）。然而，应用细胞培养研究衰老机制并不要求建立二者间的直接关联。事实上，培养的成纤维细胞可以表现出人体的遗传、代谢和调控行为，使得细胞能够在一个可预知和重现的稳定环境中经历一系列变化（***9***）。

2. 培养之外的条件

培养的细胞持续暴露于全光谱荧光灯下，不利于维持稳定的细胞状态。这种光不但会影响细胞培养条件，也会影响细胞本身。已有证据表明暴露于荧光灯下会破坏培养基

的光敏组分（*13*）。此外，反复暴露于标准荧光灯下会大幅提高单链 DNA 断裂发生的频率（*14*，*15*）。一些其他条件也会诱导细胞出现过早衰老表型，如过氧化氢（*16*）、叔丁基氢过氧化物（*17*）、紫外线（*18*）和 γ 射线（*19*）。另一个细胞应激来源是移除贴壁细胞的胰蛋白酶消化过程。比较不同频率的胰蛋白酶消化和无酶技术的结果显示每周用胰蛋白酶消化一次不影响培养细胞的复制能力（*20*）。

3. 时间线

在描述一项研究时应该考虑到体外老化研究中存在的一些内在缺陷。老化研究一般是费时的。为了精确，最好观察处于不同年龄的同一个连续培养的细胞样品，而非检查处于不同时间阶段的几个不同的培养样品。从检测年轻细胞到将该样品培养至接近衰老并检测衰老细胞通常需要几个月的时间。一种解决方案是运用多重偏移培养，即每个样品间隔几天开始培养，这样细胞可以根据实验设计同时培养和检测。连续培养衰老细胞时，保存处于各个年龄的细胞十分重要。在液氮中冷冻细胞是保持特定年龄细胞的一种好方法［详见 2.2.1 节 2. 小节下“3）冻存”］冻存和**注释 4**）。如果特定年龄的细胞培养出现问题，研究者可以通过再次冷冻再次进行研究，这也能够避免频繁订购不同年龄的细胞。Coriell 研究所（http://ccr.coriell.org/nia/）提供老化研究中所使用的多种细胞系，但不是随时都能获得所有年龄的细胞。

2.3 衰老的体外标志

2.3.1 衰老的形态学标志

已有证据证明培养细胞衰老与体内细胞衰老的一致性，特别是那些在体外和体内都会发生的事件。Macieira-Coelho（*4*）综述了一系列事件，包括分裂能力的丧失、染色质改变、迁移能力的丧失、细胞变大、体积和蛋白质含量上升，以及对生长因子的有丝分裂响应能力降低。培养细胞的复制衰老伴随特征性的形态学改变，即细胞、细胞核及核仁的增大，多核细胞增加，高尔基体凸出，内质网和细胞质中空泡数量增加，细胞质微丝增多以及溶酶体增大（**参考文献 *21*** 综述）。这些细胞似乎也表现出细胞接触敏感性提高（*21*），这可能是由细胞外基质（ECM）相互作用改变或分泌蛋白的表达改变引起的（**参考文献 *12*** 综述），这导致获得的细胞量减少、饱和密度降低（*22*）。尽管大分子的合成随年龄的增长而减少，但细胞内的 RNA 和蛋白质的含量增加，这促使后期传代细胞及其细胞核增大，以及包涵体数量增多。引起这一现象的原因可能是蛋白酶体介导的蛋白质分解减弱，RNA 转化下降，以及细胞分裂与细胞生长不再偶联（推断衰老细胞被阻断在 G_1 期的后期）。

2.3.2 衰老的生物标志物

一些重要的衰老的生物标志物可以帮助我们鉴别衰老细胞，包括培养细胞和体内细胞。**表 2.2** 列出其中的一些，包括 IGF-1、EGF、c-fos 以及衰老相关的 β-半乳糖苷酶（**表 2.2**）。IGF-1 可由多种类型的细胞产生，并在调控细胞增殖中扮演重要角色。Fer-

ber 等（***23***）在未衰老和已衰老的正常二倍体成纤维细胞中研究了 IGF-1 和它的配体（IGF-1 受体）的产生。结果表明衰老细胞中 IGF-1 mRNA 的产生低至检测不到的水平，而 IGF-1 受体 mRNA 的产生维持在可检测到的水平。另一个在衰老细胞中差异性调控的生物标志物是表皮生长因子（EGF）。已有假设提出不处于增殖的衰老人类二倍体成纤维细胞受体结合下游 EGF 信号的能力受损。Carlin 等（***24***）比较了年轻的和衰老的 WI-38 细胞裂解液，检测到直接针对 EGF 受体的蛋白酶活性。结果表明一种裂解 170 kDa EGF 受体的蛋白酶只在衰老的成纤维细胞中产生。原癌基因 *c-fos* 的产生在生长调控中非常重要，因为它是转录激活因子 AP-1 的一部分。Seshadri 和 Campisi（***25***）在 1990 年证实衰老 WI-38 细胞中 c-fos 诱导能力丧失，提示我们增殖不足一定程度上是由于 c-fos 的选择性表达抑制。β-半乳糖苷酶染色是一种原位标记衰老细胞的技术，已被广泛用于检测确定细胞培养获得的衰老细胞数量（***26～28***）。衰老相关 β-半乳糖苷酶染色（SA-β-gal）的原理和技术会在第 4 章讨论。

表 2.2　衰老的分子标志物

检测的细胞系	衰老的生物标志物	描述	参考文献
WI-38，HS74，IMR-90	IGF-1	衰老细胞不产生 IGF-1 mRNA	Ferber et al.，1993（***23***）
WI-38	EGF	衰老细胞产生变异形式的 EGF	Carlin et al.，1994（***24***）
WI-38	c-fos	晚期传代细胞中被抑制	Seshadri and Campisi，1990（***25***）
WI-38，IDH4，NHEK，CMV-MJ，HCA2	SA-β-gal	在衰老细胞中表达，但不在静止期或终末分化细胞中表达	Dimri et al.，1995（***26***） Itahana et al.（本书第 4 章）

2.3.3　细胞老化的定量分析

体外衰老过程伴随增殖能力的丧失，从而导致细胞复制下降。这种下降涉及的因素至今尚不清楚。老化研究中，必须详细描述生长状况并以群体倍增的形式记录细胞年龄，或者记录在预先设定好的一段时间后细胞群体倍增总数。总的来说，群体倍增可以通过在平皿上接种特定数量的细胞，然后在一段设定好的生长期后对这些细胞进行计数来记录。如果细胞群体发生了倍增，如一个平皿培养了 1.0×10^6 个细胞，随后进入生长期并计数为 2.0×10^6，则在细胞原有年龄的基础上增加一次群体倍增。然而，由于上述精准的数字几乎无法获得，所以为了精确，需要更加严谨的方法。**图 2.1** 概括了我们实验室总结的一个等式，考虑到了所有计数的细胞，能够计算出更加精确的群体倍增数。

$$D=C+n+\left[\frac{B-A\ (2^n)}{A\ (2^{n+1})\ -A\ (2^n)}\right]$$

图 2.1　确定培养的衰老细胞的群体倍增数的公式。此处 A 表示接种的细胞数量，B 表示生长一段时间之后计数得出的细胞数量，C 表示原先的群体倍增数，D 表示新的群体倍增数，且 n 表示满足 $A\ (2^n)\leqslant B$ 的最大值

2.4 注释

（1）大多数类型的细胞需要 0.25%（*m/V*）胰蛋白酶/0.2%（*m/V*）EDTA 溶液，用无菌 Hank's 平衡盐溶液（HBSS）或 0.9%（*m/V*）NaCl 制备以分离细胞，并螯合妨碍胰蛋白酶功能的 Ca^{2+}、Mg^{2+}。

（2）除了 BJ 成纤维细胞和其他原代细胞，室温或 37℃下浸没在胰蛋白酶中 1～2 min就足以分散细胞。BJ 成纤维细胞和其他难以解离的细胞类型可能需要在 37℃消化 5～15 min，不时在倒置显微镜下检查以确保细胞已分离。为了避免细胞呈成纤维细胞形态的凝集，不要通过敲击或振荡培养瓶或培养皿的方式搅动细胞。继续将细胞静置于 37℃中直到它们不再贴壁，或者在 15 min 后取出并终止消化（延长胰蛋白酶和细胞的接触时间会损伤细胞）。

（3）在使用细胞计数器（Improved Neubauer）对细胞进行计数之前，将细胞团块分散开非常重要。为了检查细胞活性，将 0.75 mL 细胞悬液和 0.25 mL 台盼蓝混合。取 9 μL 该混合悬液滴在细胞计数器上，盖上盖玻片，在显微镜下观察（放大 100 倍）。活细胞不被染色。计数后，计算每毫升的细胞数量：

$$\text{细胞数/mL}=\text{每个方格中细胞计数的平均数}\times\text{稀释系数}\times 10^4$$

（4）冷冻保存培养基由 90%～95%的完全培养基和 5%～10%的二甲基亚砜或甘油组成。

致谢

本工作部分由 NSF GK-12 Fellowship（to S. M. O. Phipps）、癌症预防和控制训练计划（the Cancer Prevention and Control Training Program，to J. B. Berletch）、the UAB Ovarian SPORE、the UAB Evelyn McKnight Brain Institute 提供支持。

参 考 文 献

1. Rubin, H. (1997) Cell aging in vivo and in vitro. *Mech. Ageing Dev.* **98**, 1-35.
2. Lai, S. R., Phipps, S. M. O., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2005) Epigenetic control of telomerase and modes of telomere maintenance in aging and abnormal systems. *Front. Biosci.* **10**, 1779-1796.
3. Hadley, E. C., Lakatta, E. O., Borrison-Bogorad, M., Warner, H. R., and Hodes, R. J. (2005) The future of aging therapies. *Cell* **120**, 557-567.
4. Macieira-Coelho, A. (1988) Behavior of cells in culture and physiopathology of organism, in *Biology of Normal Proliferating Cells in vitro. Relevance for in vivo Aging* (von Hahn, H. E, ed.). Karger, Basel, Switzerland: 6-20.
5. Rubin, H. (1966) A substance in conditioned medium which enhances the growth of chick embryo cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.* **41**, 138-148.
6. Macieira-Coelho, A. (2000) Ups and downs of aging studies in vitro: The crooked path of science. *Gerontol.* **46**, 55-63.
7. Biessmann, H. and Mason, J. M. (1997) Telomere maintenance without telomerase. *Chromosoma* **106**, 63-69.
8. Hayflick, L. and Moorhead, E S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**,

585-621.

9. Cristofalo, V. J., Beck, J., and Allen, R. G. (2003) Cell Senescence: An evaluation of replicative senescence in culture as a model for cell aging in situ, commentary and author's response to commentary. *J. Gerontol.* **58A**, 776-781.
10. Martin, G. M., Sprague, C. A., and Epstein, C. J. (1970) Replicative life-span of cultivated human cells. *Lab Invest.* **23**, 86-92.
11. Schneider, E. C. and Mitsui, Y. (1976) The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3584-3588.
12. Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., and Tresini, M. (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 827-848.
13. Wang, R. J. (1976) Effect of room fluorescent light on the deterioration of tissue culture medium. *In Vitro* **12**, 19-22.
14. Bradley, M. O. and Sharkley, N. A. (1976) Mutagenicity and toxicity of visible fluorescent light to cultured mammalian cells. *Nature* **266**, 724-727.
15. Bradley, M. O., Hsu, I. C., and Harris, C. C. (1979) Relationship between sister chromatid exchange and mutagenicity, toxicity and DNA damage. *Nature* **282**, 318-320.
16. Frippiat, C., Chen, Q. M., Remacle, J., and Toussaint, O. (2000) Cell cycle regulation in H_2O_2 induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins. *Exp. Gerontol.* **35**, 733-745.
17. Dumont, E, Burton, M., Chen, Q. M., et al. (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblasts. *Free Radic. Med.* **28**, 361-373.
18. Ma, W., Wlaschek, M., Hommel, C., Schneider, L. A., and Scbarffetter-Koehanek, K. (2002) Psoralen plus UVA (PUVA) induced premature senescence as a model for stress-induced premature senescence. *Exp. Gerontol.* **37**, 1197-1201.
19. Seidita, G., Polizzi, D., Costanzo, O., Costa, S., and Di Leonardo, A. (2000) Differential gene expression in p53-mediated G (1) arrest of human fibroblasts after gamma-irradiation or N-phosphoacetyl-L-aspartate treatment. *Carcinogenesis* **21**, 2203-2210.
20. Hadley, E. C., Kruss, E. D., and Cristofalo, V. J. (1979) Trypsinization frequency and loss of proliferative capacity in WI-38 cells. *J. Gerontol.* **34**, 170-176.
21. Cristofalo, V. J. and Pignolo, R. J. (1993) Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiological Reviews* **73**, 617-638.
22. Cristofalo, V. J. (1988) Cellular biomarkers of aging. *Exp, Gerontol.* **23**, 297-307.
23. Ferber, A., Chang, C., Sell, C., et al. (1993) Failure of senescent human fibroblast to express the insulin-like growth factor-1 gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 17, 883-17, 888.
24. Carlin, C., Phillips, R D., Brooks-Frederich, K., Knowles, B. B., and Cristofalo, V. J. (1994) Cleavage of the epidermal growth factor receptor by a membrane-bound leupeptin-sensitive protease active in nonionic detergent lysates of senescent but not young human diploid fibroblasts. *J. Cell Physiol.* **160**, 427-434.
25. Seshadri, T. and Campisi, J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science Wash. DC* **247**, 205-209.
26. Dimri, O. R, Lee, X., Basile, G., et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367.
27. Alexander, K., Yang, H. S., and Hinds, P. W. (2004) Cellular senescence requires CDK5 repression of Racl activity. *Mol. Cell Biol.* **24**, 2808-2819.
28. Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *B. Bone* **33**, 919-926.

第3章　检测细胞衰老的生物标志物的方法：衰老相关β-半乳糖苷酶检测

Methods to Detect Biomarkers of Cellular Senescence: The Senescence-Associated β-Galactosidase

Koji Itahana, Judith Campisi, Goberdhan P. Dimri

摘要　大多数体外培养的正常人体细胞在累积一定次数的细胞分裂之后，或者受各种致癌因素刺激之后都要经历细胞衰老，这很可能也发生在体内。不可逆的生长停滞和某些特定的功能改变是细胞衰老的特征。可以通过衰老细胞DNA合成能力丧失来识别培养中的衰老细胞，但静止期细胞也表现出同样的特征。前些年，我们描述了一种衰老表型相关的生物标志物——衰老相关β-半乳糖苷酶（SA-β-gal），可以使用人工合成底物X-gal，用组织化学染色方法检测到。SA-β-gal标志物并不依赖于DNA的复制而存在，因而可以大致区分衰老细胞与静止期细胞。检测SA-β-gal的方法是一种简便的基于单个细胞的检测方法，甚至可以在混杂的细胞群或衰老组织中识别衰老细胞，如对老年个体进行皮肤活组织切片检查。因为SA-β-gal易于检测，它现在是广泛使用的衰老的生物标志物。本章详细描述检测SA-β-gal的方法，包括最近的一些改进。

关键词　细胞衰老；生物标志物；SA-β-gal；老化；免疫学染色；胸腺嘧啶标记；p16；ARF

3.1　引言

培养中的正常人体细胞在有限次数的细胞分裂，或受潜在致癌损伤（如直接DNA损伤或特定癌基因表达）的刺激之后进入不可逆的生长停滞，同时呈现大而扁平的形态，这在体内也可能发生，该过程被称作细胞衰老，Hayflick和他的同事在培养人成纤维细胞的实验中首次提出这一概念（*1*）。细胞衰老现在被看作一种抗增殖响应和一种肿瘤抑制机制（*2*）。另外，人们认为衰老细胞在老化组织中的积累也会诱发年龄相关的病理过程（*3*）。普遍接受的观点是，人成纤维细胞和其他类型的细胞在重复分裂之后的衰老是因为它们最终获得一个以上缩短的、功能异常的端粒（*4*，*5*）。最近有证据表明，细胞也会因非端粒信号而经历衰老，如特定癌基因释放的强大的有丝分裂信号、直接DNA损伤和染色体重构剂（*5*，*6*）。一方面，因为衰老细胞被认为能够促使一系列年龄相关的病理过程，所以清除衰老细胞可能有助于这些病理变化的治疗；另一方面，因为衰老响应是一种肿瘤抑制机制，使用药物诱导肿瘤细胞的衰老有助于癌症的治疗。因

此，在研究诱导衰老和废除衰老的药物中，对衰老细胞的识别都很重要。

可通过检测非最佳培养条件下的DNA复制或衰老时差异表达的基因来识别衰老细胞，但针对这些特征的检测特异性差，而且冗长耗时。例如，DNA复制检测无法区分衰老细胞与静止期细胞及终末分化细胞。此外，静止期和终末分化细胞也表现出增殖相关基因的下调以及生长抑制基因的上调。几年前，我们偶然发现衰老细胞表现出β-半乳糖苷酶活性，可以在pH 6.0时用组织化学方法检测（***7***）。我们称这种活性为衰老相关β-半乳糖苷酶，或SA-β-gal，并提出它是培养中或体内衰老细胞的一种很好的生物标志物。这个标志物只在衰老细胞中表达，而不在衰老前或静止期的成纤维细胞中表达，也不在终末分化的角质形成细胞中表达（***7***）。从不同年龄供者身上取得皮肤样品，真皮成纤维细胞和上皮角质形成细胞中的SA-β-gal随供体年龄增加而增强（***7***）。尽管我们发现这个标志物并非十分完美的衰老或年龄依赖标志物（如它在长时间保持满层贴壁的细胞中也会表达），但我们清楚它与衰老表型紧密相关，而且它的表达频率在衰老组织中会增加，这与体内衰老细胞随年龄增长而积累的现象相一致。一些后续的研究已经加强了这一观点，即SA-β-gal是一种十分有用的生物标志物，既可以检测培养的衰老细胞，又可以检测啮齿类和灵长类动物体内的衰老细胞（***5***，***8～16***）。

多种方法可以诱导细胞衰老，最普遍的方法是对细胞进行连续传代培养，其他诱导衰老的方法包括：

（1）放射性物质（X射线或γ射线）导致的DNA损伤，或与DNA相互作用的药物，如博莱霉素（Bleomycin）（***17～19***）。

（2）氧化应激，如暴露于高氧（40%～50%氧气）或过氧化氢之下，或抑制如超氧化物歧化酶等清除活性氧（ROS）的酶（***20～22***）。

（3）致癌或增殖信号，如活性癌蛋白的表达，如RAS（***23***）、RAF（***24***）以及由E2F1（***2***）或ETS2（***26***）过度表达产生的促有丝分裂刺激。

（4）特定肿瘤抑制蛋白的过度表达，如ARF（***25***）、p16（***27***）或PML（***28***，***29***）。

大多数以上提到的诱导细胞衰老的例子可以通过检测细胞合成DNA障碍、SA-β-gal染色或共染色增强以及其他最近被证实的衰老标志物，如p16肿瘤抑制蛋白来验证（***30***）。

3.2　材料

3.2.1　细胞培养

（1）Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（Invitrogen，Carlsbad，CA），添加10%胎牛血清（HyClone，Ogden，UT）。

（2）100×青霉素-链霉素［10 000 U青霉素（base），10 mg/mL链霉素（base），使用青霉素G（钠盐）和0.85%的硫酸链霉素盐］（Invitrogen，Carlsbad，CA）。

（3）正常人体成纤维细胞：WI-38和BJ品系（American Type Culture Collection［ATCC］，Manassas，VA）。

3.2.2　培养细胞的固定和SA-β-Gal染色

（1）磷酸盐缓冲液（PBS）（10×储备液）：1.37 mol/L NaCl，27 mmol/L KCl，100 mmol/L Na_2HPO_4，18 mmol/L KH_2PO_4（必要时可用HCl将pH调节到7.4）。

（2）固定液：含有3.7%的甲醛的PBS。将1 mL 37%的甲醛加入到9 mL PBS中。需在每次实验前配制新鲜溶液（**注释1**）。

（3）染色液：1 mg/mL X-gal（Stratagene，La Jolla，CA），40 mmol/L柠檬酸/磷酸钠盐缓冲液（pH 6.0），5 mmol/L铁氰化钾（Sigma，St. Louis，MO），5 mmol/L亚铁氰化钾（Sigma），150 mmol/L NaCl，2 mmol/L $MgCl_2$。

（a）X-gal溶液：X-gal用20 mg/mL的二甲基甲酰胺（DMF）溶解并装入深色的或铝箔包裹的玻璃小瓶或者其他类似的容器中，以达到避光的目的。此溶液可−20℃保存数天。

（b）柠檬酸/磷酸钠盐缓冲液（0.2 mol/L，pH 6.0）：将36.85 mL 0.1 mol/L柠檬酸溶液和63.15 mL 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液混合。校正其pH至6.0（**注释2**）。此缓冲液可室温保存数月。

（c）柠檬酸溶液（0.1 mol/L）：将一水合柠檬酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）加水溶解至0.1 mol/L。此溶液可室温保存数月。

（d）磷酸钠溶液（0.2 mol/L）：磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）或水合磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$）在水中溶解至0.2 mol/L 。此溶液可室温保存数月。

（e）铁氰化钾溶液（100 mmol/L）：将铁氰化钾在水中溶解至100 mmol/L ，4℃保存，并用铝箔包裹以避光，可保存数月。

（f）亚铁氰化钾溶液（100 mmol/L）：将亚铁氰化钾在水中溶解至100 mmol/L ，4℃保存，并用铝箔包裹以避光，可保存数月。

3.2.3　组织样品的固定和SA-β-Gal染色

（1）固定液：含有1%的甲醛的PBS。

（2）染色液：组织样品的染色液与培养细胞所用的一样（如前所述）。

（3）复染液：伊红（Sigma）。

3.2.4　[^3H]胸腺嘧啶标记和放射自显影

（1）[Methyl-^3H]胸腺嘧啶（70 Ci-95 Ci/mmol，1 mCi/mL），（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ，cat. no. TRK758）。

（2）含有100 mg/L $CaCl_2$和100 mg/L $MgCl_2$的PBS（**注释3**）。

（3）甲醇。

（4）照相乳胶[NTB2，cat. no. 165 4433（^3H），Kodak，Rochester，NY]：乳胶用蒸馏水以1∶2或1∶3的比例稀释，分装到塑料管中，用铝箔包裹以避光，4℃保存。

（5）Kodak D-19显影液（Kodak）。

（6）Kodak Rapid-Fix（Kodak）。

(7) Giemsa工作液：用磷酸盐缓冲液pH 6.0（74 mmol/L NaH_2PO_4，9 mmol/L Na_2HPO_4）将1 mL Giemsa储备液（0.4 *m*/*V* 在甲醇缓冲溶液中，pH 6.9）（Fischer Scientific，Pittsburgh，PA）稀释到总体积10 mL。

3.2.5 免疫染色

(1) Lab-Tek Ⅱ Chamber Slide Ⅱ（Nunc，Rochester，NY）。

(2) 固定液：含有3.7%的甲醛（**注释1**）。

(3) 透化处理溶液：含0.5% Triton的PBS。

(4) 封闭液：含0.5% BSA的PBS（**注释4**）。

(5) 抗体稀释缓冲液：含0.5% BSA的PBS（**注释4**）。

(6) 二抗（Bio-Rad，Hercules，CA）。

(7) 封固剂；含DAPI（4′,6′-二脒基-2-苯基吲哚）的VectaShield（Vector Laboratories，Burlingame，CA）。

3.3 方法

3.3.1 贴壁培养细胞的SA-β-Gal染色

(1) 接种2×10^4～5×10^4个细胞于35 mm培养皿或其他类似的容器中，培养1～3天。

(2) 用PBS洗涤细胞2次。

(3) 室温下用现配的3.7%的甲醛PBS溶液固定细胞3～5 min。

(4) 用PBS洗涤细胞2次。

(5) 加入X-gal染色液（每个35 mm的培养皿加入1～2 mL）。

(6) 37℃下用染色液孵育细胞（不在CO_2培养箱内）。

(7) 2 h内可观察到一些细胞蓝染，12～16 h后达到最大程度染色（**注释5**）。**图3.1**示衰老前和衰老的WI-38成纤维细胞的SA-β-gal染色，以及对照组和ARF过表达的U2OS细胞。

3.3.2 组织样品的SA-β-gal染色

(1) 获取活检标本并在PBS中简单冲洗以除去血液。

(2) 放置于Tissue-Tek Cryomold（VWR，cat. no. 25608-916）的OCT复合物中(Miles Scientific，Naperville，IL)，并在含有二甲基丁烷的液氮中迅速冷冻（**注释6**）。

(3) 尚未使用的样品可−80℃保存，但冷冻时间较长后酶不稳定。总体上，样品冷冻后应马上或在几小时之内处理。

(4) 将样品切成4 μm的切片。

(5) 将切片放在硅烷处理过的载玻片上以使其黏着。

(6) 室温下用1%甲醛（溶于PBS）固定切片1 min。

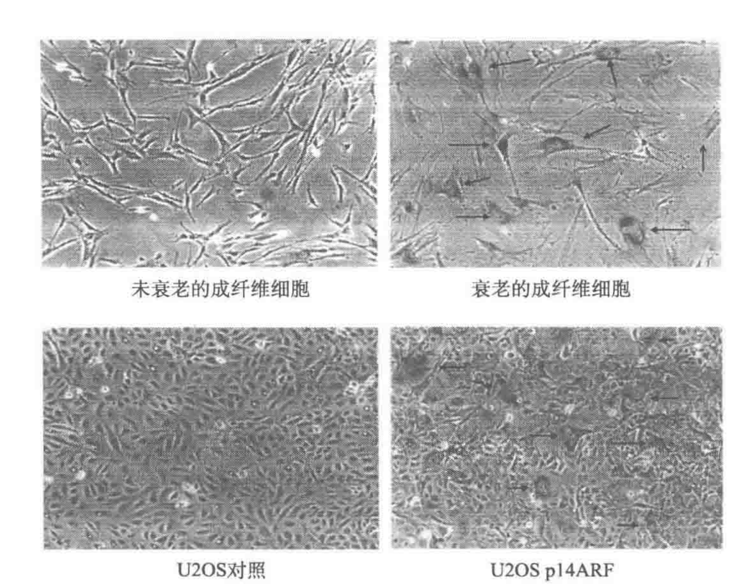


图 3.1 对人 WI-38 成纤维细胞（上排）和人 U2OS 骨肉瘤细胞（下排）的 SA-β-gal 染色。上排：衰老前的人 WI-38 成纤维细胞（Fb）传代培养直至衰老。衰老前的和衰老的 Fb 平铺于 35 mm 的培养皿中培养 3 天，并按照所述的方法进行固定，染色，并拍照。箭头标示出的是衰老细胞。下排：转染了表达 p14ARF 肿瘤抑制基因的逆转录病毒的 U2OS 细胞，这一基因会诱导衰老表型，然后如文中所述选出表达 p14ARF 的细胞（***25***）。对照组（转染非插入的逆转录病毒）和表达 p14ARF 的细胞平铺于 35 mm 的培养皿上，培养 3 天，并按照所述的方法进行固定、染色，并拍照。箭头标示出的是表达 p14ARF 的衰老 U2OS 细胞，被 SA-β-gal 标志物的存在所证实

（7）用 PBS 洗涤 3 次。

（8）将切片浸入 SA-β-gal 染液，过夜。

（9）用伊红复染。

（10）用明场显微镜观察（**注释 7**）。示例见**图 3.2**。

3.3.3 培养细胞的胸腺嘧啶标记

（1）用 10 μCi/mL 的［methyl-^{3}H］胸腺嘧啶脱氧核苷标记细胞 3 天或以上（**注释 8**）。

（2）37℃水浴预热 Kodak 乳胶。

（3）用含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 润洗培养皿 3 次（**注释 3**）。

（4）用甲醇润洗培养皿 3 次。

（5）风干培养皿 10 min。



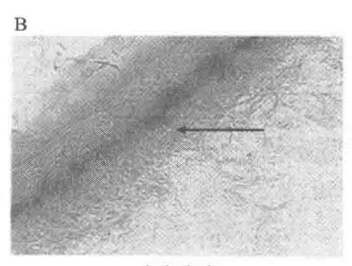


图 3.2　SA-β-gal 染色的人体皮肤样品，取自年老和年轻的供体。皮肤样品切片，SA-β-gal 染色、复染，并按方法中所述拍照，放大倍数为 120×

(A) 取自年轻供体的真皮和表皮，SA-β-gal 阴性；(B) 取自年老供体的表皮，含有大量的 SA-β-gal 阳性细胞，如箭头所指（部分摘自**参考文献 7**，经美国国家科学院许可）

(6) 在装有安全灯［Kodak filter No. 2，cat. no. 1521525；15-V 灯泡（与乳胶距离不小于 4 英尺①)］的暗室中，用一次性移液管向培养皿中添加乳胶，用移液器去掉培养皿中多余的乳胶，这样培养皿就被一薄层乳胶覆盖。移去的多余乳胶可放回原管中。避免乳胶中掺入气泡（**注释 9**）。

(7) 将培养皿放置在不透光的容器中（一般用铝箔包裹），至少 18h。

(8) 在暗室中用移液管加入显影液并等待 3 min。

(9) 用水清洗培养皿 2 次。

(10) 在暗室中加入定影液并等待 5 min。

(11) 从暗室中取出培养皿并用清水洗涤若干次。

(12) 风干培养皿 10 min。

(13) 加入新制备 Giemsa 工作液并等待 5 min（**注释 10**）。

(14) 清水冲洗培养皿。

(15) 通过对几个随机选取视野中细胞核总数（蓝色和黑色，总核数一般为 100～500 个）和标记的细胞核（黑色）数量进行计数确定放射性标记的细胞核所占的比例（%LN)。%LN=（被标记的细胞核数/总核数）×100%。

3.3.4　胸腺嘧啶标记的培养细胞的 SA-β-gal 染色

(1) 用 10 μ Ci/mL 的［methyl-^{3}H］胸腺嘧啶脱氧核苷标记细胞 3 天或以上。

(2) 如前所述洗涤、固定、染色以获得 SA-β-gal 活性染色（**副标题 3.3.1**）。

(3) 待蓝色显影后，如上所述洗涤，用乳胶覆盖细胞，显影，定影（**副标题 3.3.3**），跳过 Giemsa 染色的一步。

① 1 英尺=0.3048 m，后同。

3.3.5　培养细胞的SA-β-gal免疫染色

（1）在有四壁的室形玻片中培养细胞。

（2）如前所述洗涤、固定和染色以获得SA-β-gal活性染色（**副标题3.3.1**）。

（3）待蓝色显影后，用PBS洗涤2次。

（4）4℃用冷的0.5% Triton X-100（溶于PBS中）透化处理细胞。

（5）用0.5% BSA（溶于PBS中）封闭玻片20 min（**注释4**）。

（6）在0.5%的BSA中，室温2 h或4℃过夜孵育载玻片和一抗（**注释4**）。

（7）用PBS清洗3次，每次10 min。

（8）在0.5%的BSA中，室温孵育1 h载玻片和二抗。

（9）用PBS清洗3次，每次10 min。

（10）在含DAPI的封固剂中封固细胞。

（11）明场显微镜下能够很好地识别被蓝染的具有SA-β-gal活性的细胞，免疫染色可用落射荧光显微镜检测。**图3.3**为SA-β-gal和p16共染色的示例。

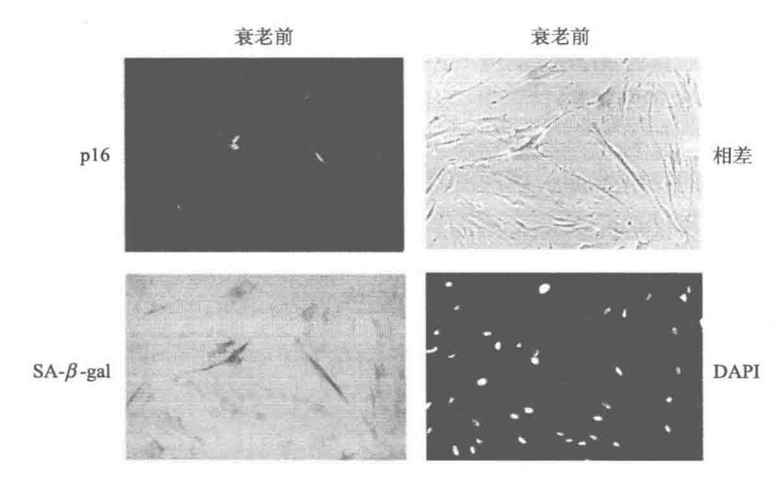


图3.3　对包含混合的衰老前和衰老的WI-38细胞培养的SA-β-gal和p16共染色。共染色是按照方法中描述的过程完成的。SA-β-gal染色可在相差和明场显微镜下成像并拍照。DAPI和p16染色可用放大倍数为200×的荧光显微镜成像并拍照［摘自**参考文献30**，经美国微生物协会（Washington，DC）许可］

3.4　注释

（1）为方便起见，SA-β-gal染色和免疫染色所需的含10%福尔马林的中性缓冲液可以购买市售的小容量分装（Sigma，cat. no. HT5011）。此溶液可在室温下保存，每小瓶可以在开启后使用1个月。对于某些细胞和组织，新鲜制备的溶于PBS的2%的甲

醛 + 0.2%的戊二醛溶液能够更好地保持细胞形态。小量分装的25%的戊二醛可以从Sigma获得（cat. no. G5882），−20℃保存。

（2）某些种类的细胞，如小鼠成纤维细胞和人上皮细胞的SA-β-gal染色强度略低。略微降低pH有时可以提高染色强度。在pH 5.0～6.0内尝试若干个pH以优化染色条件，要确保同时包括阳性和阴性对照。大多数细胞由于内源溶酶体的β-半乳糖苷酶活性，无论是否处于衰老状态，在pH 4.0时的染色都显阳性，因此应谨慎地降低染色液的pH。

（3）含Ca^{2+}和Mg^{2+}的PBS用于减轻细胞在染色操作过程中从培养皿上脱离的状况。

（4）SA-β-gal和其他蛋白质的免疫共染色是抗原抗体特异性的。衰老细胞中经常出现背景免疫染色强度过高的情况，用PBS稀释的10%的脱脂牛奶封闭或将一抗或二抗稀释后使用可以缓解这种情况。

（5）如果培养的成纤维细胞满层贴壁的时间过长，可能出现不依赖衰老的、密度诱导的SA-β-gal染色（**7**）。这一现象在将满层细胞传代培养后一般可以消失。

（6）用液氮直接冰冻可能使样品破碎，因此，最好将样品置于OCT中，放在干冰上。避免重复冻融样品，那样会影响细胞形态并破坏SA-β-gal酶的活性。

（7）某些组织结构，如毛囊及外分泌腺腔组织，会呈现与衰老无关的深染（**7**）。

（8）需要标记3天以精确区分衰老的和增殖中的细胞。

（9）照相乳胶的背景在用于衰老细胞时会有所增强。如果乳胶已过保质期，使用前须在空白载玻片上检查背景。用乳胶覆盖平皿的操作要迅速，要在乳胶在室温下变黏稠之前完成。除此之外，乳胶层要薄，以优化标记的细胞核的显影。

（10）Giemsa染色应控制在10 min以内，以避免可能出现的乳胶脱离培养皿的情况。

致谢

感谢我们过去的合作研究者，尤其是Dr. M. Peacocke，以及从前J. Campese的实验室成员，他们帮助完善了检测方法。本工作由国立衰老研究所（J. C.）和国立癌症研究所（G. P. D.）提供资金支持。

参考文献

1. Hayflick, L. and Moorhead, R S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621.
2. Campisi, J. (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol*. **11**, S27-S31.
3. Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522
4. de Lange, T. (2001) Cell biology. Telomere capping-one strand fits all. *Science* **292**, 1075-1076.
5. Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G. R (2004) Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**, 1-10.
6. Ben-Porath, I. and Weinberg, R. A. (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J.*

Clin. Invest. **113**, 8-13.

7. Dimri, G. R, Lee, X., Basile, G., et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367.
8. Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., et al. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. lnvest.* **114**, 1299-1307.
9. Cao, L., Li, W., Kim, S., Brodie, S. G., and Deng, C. X. (2003) Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brcal fulllength isoform. *Genes Dev.* **17**, 201-213.
10. Sun, L. Q., Lee, D. W., Zhang, Q., et al. (2004) Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-1ike gene, PASG. *Gene Dev.* **18**, 1035-1046.
11. Choi, J., Shendrik, I., Peacocke, M., et al. (2000) Expression of senescenceassociated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* **56**, 160-166.
12. Castro, P., Giri, D., Lamb, D., and Ittmann, M. (2003) Cellular senescence in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **55**, 30-38.
13. Ferlicot, S., Durrbach, A., Ba, N., Desvaux, D., Bedossa, P., and Paradis, V. (2003) The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum. Pathol.* **34**, 924-928.
14. Mishima, K., Handa, J. T., Aotaki-Keen, A., Lutty, G. A., Morse, L. S., and Hjelmeland, L. M. (1999) Senescence-associated beta-galactosidase bistochemistry for the primate eye. Invest. Ophthalmol *Vis. Sci.* **40**, 1590-1593.
15. Melk, A., Schmidt, B. M., Takeuchi, O., Sawitzki, B., Rayner, D. C., and Halloran, P. E (2004) Expression of p 16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int.* **65**, 510-520.
16. Pendergrass, W. R., Lane, M. A., Bodkin, N. L., et al. (1999) Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (Macaca mulatta). *J. Cell. Physiol.* **180**, 123-130.
17. Di Leonardo, A., Linke, S. E, Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cipl in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540-2551.
18. Robles, S. J. and Adami, G. R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to pl61NK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**, 1113-1123.
19. Lombard, D. B., Chua, K. E, Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., and Alt, E W. (2005) DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**, 497-512.
20. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* **220**, 186-193.
21. Chert, Q. M., Bartholomew, J. C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J. D., and Ames, B. N. (1998) Molecular analysis of H~O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* **332** (Pt 1), 43-50.
22. Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., and Guarente, L. (2003) Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 38, 966-38, 969.
23. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and pl6INK4a. *Cell* **88**, 593-602.
24. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J. M. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12**, 2997-3007.
25. Dimri, G. E, Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and pl4 (ARF) tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 273-285.
26. Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T. J., et al. (2001) Opposing effects of Ets and Id proteins on pl6INK4a expression during cellular senescence. *Nature* **409**, 1067-1070
27. Kato, D., Miyazawa, K., Ruas, M., et al. (1998) Features of replicative senescence induced by direct addition

of antennapedia-pl6INK4A fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.* **427**, 203-208.

28. Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., et al. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-210.
29. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S. W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* **14**, 2015-2027.
30. Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., et al. (2003) Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 389-401.

第4章　分选年轻与衰老细胞的方法

Methods for Cell Sorting of Young and Senescent Cells

João F. Passos，Thomas von Zglinicki

摘要　细胞衰老，即原代培养细胞复制能力最终不可逆的丧失，已经成为衰老过程研究中一种普遍应用的模型。然而，即使在基因型相同的克隆群体中，人成纤维细胞的复制寿命也是有差异的，衰老细胞所占的比例随着群体倍增数的增加而升高，而不是所有细胞同步地进入衰老。因此，研究群体培养中的单个细胞对理解复制衰老有极其重要的意义。细胞分选是一种应用流式细胞仪，根据不同细胞的特征来物理分离细胞方法。在此，我们将介绍多种用于从大量生长细胞中物理分选提前衰老的细胞方法，同时讨论不同的方法对分选出的细胞群体后期分析的影响。

关键词　Ki67；γ-H2A. X；BrdU；ROS；MMP；细胞分选；复制衰老；异质性

4.1　引言

在一个现行的经典实验中，Smith 和 Whitney 发现了来自克隆群体的不同个体细胞的倍增能力有差异（*1*），暗示了存在随机因素决定细胞的复制潜力。

其他研究也表明，随着群体倍增数的增加，有分裂能力的细胞在总体中所占比例会逐渐降低，可应用 BrdU 标记法（*2*）、Ki67 染色（*3*）以及 p53 报告实验（*4*）来检测。数据同时显示，γ-H2A. X 着色细胞的百分比随群体倍增的增加而增大，γ-H2A. X 是衰老相关 DNA 损伤位点的标志物，会对缩短的、功能异常的端粒做出反应（*5*）。

数据一致地显示了一定百分比的细胞会退出细胞周期，且这一比例随着培养时间延长而上升。从混合细胞培养中物理分离出这些“早退者”之后，可以确定其特性。

衰老细胞与相对增殖细胞在众多的参数上均有差异，包括基因表达模式，细胞及核的大小、形状和结构，线粒体功能和活性氧（ROS）的产生，老年斑（脂褐素）的积累，以及在近中性的 pH 环境中 β-半乳糖苷酶的活性（衰老相关 β-半乳糖苷酶，即 S-β-gal）等，但并非所有这些标志物都适用于荧光激活细胞分选（FACS）物理分离细胞。更重要的是，大多数可能的标志物在增殖和衰老细胞间显现渐进性的差异，目前尚未发现完全特异性的单一标志物。因此，我们在此叙述多种可以从混合培养物中物理分选衰老细胞的方法，其中一些方法应用抗体对细胞核抗原染色，因此需要增加细胞通透性并固定细胞，这将严重限制分选后的分析方法的选择。但是，这些方法大多数时候都可以清楚地区分衰老和未衰老的细胞群体。相反，只有为数不多的标志物，如细胞大小和脂褐素含量，可以对活的衰老细胞进行分选，或者将其荧光染色。然而这些参数在年轻和

衰老的细胞之间基本上是均匀分布的，而分选过程中的截止取舍点必须人为设置。这就意味着无法定量评估衰老和未衰老细胞的出现频率，分选会导致衰老细胞富集，但这并不能产生一个“纯”的细胞群体。这一问题可以通过在受衰老调控转录的基因中转染表达绿色荧光蛋白（GFP）的报告基因构建来克服。我们对 FACS 分选的衰老细胞应用了 p21 启动子驱动的 EYFP 报告基因，与“天然”活细胞标志物相比，这种方法能够更清楚地区分衰老细胞（***6***）。这种方法可能的缺点在于报告基因的随机插入（如通过逆转录病毒转染）可能诱导额外的差异，而靶向插入后再进行分选将使在衰老细胞株上进行的实际实验的时间大大减少。不过，如何产生携带稳定表达报告基因的细胞这一问题超出了本章的范围，将不会在这里加以叙述。

4.2　材料

4.2.1　细胞培养

（1）Dulbecco’s modified Eagle’s medium（DMEM），添加 10%胎牛血清，1%青霉素/链霉素，1%谷氨酸。

（2）胰蛋白酶-EDTA 溶液（5 g 胰蛋白酶，2 g EDTA 溶于 1 L 蒸馏水中）。

4.2.2　免疫荧光（细胞核抗原 Ki67 和 γ-H2A. X）

（1）PBG-Triton：0.2%鱼皮明胶，0.5%牛血清白蛋白（BSA）溶于磷酸盐缓冲液（PBS）中，0.5% Triton X-100。

（2）多聚甲醛（2%）。

（3）异硫氰酸荧光素（FITC）标记的单克隆抗体 AntiKi67（DAKO，cat. no. F0788）。

（4）小鼠单克隆抗体 Anti-γ-H2A. X（Upstate Biotechnology，cat. no. 05-0636）。

（5）荧光素结合的二抗 AlexaFluor 594（Molecular Probes，cat. no. A-21207）。

4.2.3　BrdU 染色

（1）缓冲洗涤液：1×不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS，含 0.5%（*m/V*）牛血清白蛋白 BSA（Sigma）。

（2）变性液：2 mol/L HCl，溶于 1×不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，含 0.5%（*m/V*）牛血清白蛋白（Sigma）（在向 PBS 中加入 HCl 之前溶解 BSA，以避免 BSA 永久沉淀）。

（3）稀释缓冲液：1×不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS，含 0.5%（*m/V*）Tween-20（Sigma）。

（4）FITC 标记的 AntiBrdU 单克隆抗体（Pharmingen，cat. no. 33284X）或 FITC 标记的免疫球蛋白（IgG）对照（Pharmingen，cat. no. 35404X）。

注意：BrdU 是已知的致癌物。

（5）碘化丙啶（PI）（注意：PI 已知有毒并且致癌）。

(6) 70%冰乙醇（BDH Lab Suppliers）。

(7) 0.1 mol/L 硼酸钠（Sigma），pH 8.5。

4.2.4 FACS 分析和分选

(1) 不同大小或荧光强度的 FACS 校准珠（Sphero™ Rainbow Calibration Beads，PharMingen，cat. no. 556286）或 Partec 3 μmol/L 的校准珠（Partec，cat. no. 05-4007）。

(2) 1% Triton X-100，脱气的 1×PBS。

4.2.5 ROS 和 MMP 的活体染色

(1) 粉末状二氢罗丹明（DHR123）（每管 10 mg，cat. no. D-632）或立即可用的溶于二甲基亚砜（DMSO）的 5 mmol/L 储备液（cat. no. D-23806）可以从 Molecular Probes 获得。一瓶 10 mmol/L 的 DHR123 储备液是通过向 10 mg 管中加入 2.89 mL DMSO 制成的。由于 DHR123 容易在空气中氧化，所以储备液需在 N_2 环境中以每管 100 μL 快速分装并在−20℃冷冻。

(2) 5,5′,6,6′-四氯-1,1′,3,3′-碘化四乙基苯并咪唑羰花青（JC-1）（5 mg；Molecular Probes，cat. no. T-3168）。制备储备液：将 JC-1 以 2.5 mg/mL 溶于 DMSO，即向 5 mg管中加入 2 mL DMSO。为避免反复冻融，立即将储备液分装，每份足够一天实验使用，并−20℃保存备用。JC-1 具有光敏特性，因此染色操作必须在无强光直射的条件下进行并在暗处孵育。

(3) 无酚无添加剂 RPMI 1640（Sigma）。

(4) 无添加剂 DMEM（Sigma）。

4.3 方法

4.3.1 设置流式细胞仪

FACS 分选机在复杂性上差别相当大，有复杂精密的闭合回路多通道高速分选仪，必须由经过培训的专业人士操作而且专门用于分选操作。但使用简单（而且便宜）的仪器就足以很好地完成分选工作，这些仪器的代表特征在于为已有的流式细胞仪配备了分选室。在这些仪器上，分选功能是附加功能而非常规功能。用这种方式做细胞分选实验时，需要考虑到许多问题。

(1) 准备和校准流式细胞仪：鞘液在使用前必须保证超纯质并脱气，尤其对于依靠压电晶体工作的分选仪。这一系统用荧光珠校准以确保最佳性能和可重现性。使用两种不同大小校准珠制剂的混合物检测分选细效率和分离质量。对已分离的部分进行再分析，分选部分应当 20 倍富集。对一定体积的再分析也可用于计数分选获得的颗粒，从而优化分选条件（**注释 1**）。

(2) 无菌：即使在简单的流式细胞仪上也可以实现无菌分选。我们的消毒方法是使

用0.1%的次氯酸盐溶液作为样品混合鞘液流过系统20～30 min，并用该溶液彻底擦拭外口。在漂白和消毒之后，使用已脱气的1×不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的PBS流过系统10 min以去除残留的会产生细胞毒性的消毒剂。对于分选实验，鞘液经高压灭菌处理，且装鞘液的容器由可高压灭菌的玻璃瓶所代替。FACS管使用0.1%漂白剂预先无菌处理，并用1×不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的PBS中和。分选过的细胞直接流入装有含5%的青霉素/链霉素的DMEM培养基的瓶中，以尽可能把污染降到最低。

(3) 分选速度：衰老的成纤维细胞个体大并且对切应力敏感。尽管某些系统提供非常高的分选速度，但我们发现在高速下回收的细胞的质量和完整性都有所下降。如果分选得到的细胞用于分析，我们将安全速度的上限定为大约每秒300个细胞。如果是为了获得活的用于进一步培养的衰老细胞，我们建议分选速度不要大于每秒100个细胞。

4.3.2 分选已固定的细胞

1. 细胞核抗原的抗体染色

很多细胞核抗原是周期中细胞或非周期中细胞的特征，不论周期中的细胞处于周期中的哪个阶段（G_1期、S期、G_2期或M期），Ki67和PCNA都有表达，而在静息细胞（G_0）中没有表达，因此可以作为衰老细胞的“阴性”标志物。研究表明人成纤维细胞和间皮细胞的Ki67阳性细胞核比例会随群体倍增水平升高而不断下降（***3***）。衰老细胞中，细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子p16和p21上调（**注释2**），因此它可作为衰老细胞的“阳性”标志物。至今尚不清楚不同细胞p16和p21的上调是选择性的还是相继的（**参考文献7**）。最近研究显示，持续形成的DNA损伤位点，更明确地说，即H2A.X组蛋白的Ser-139位点被ATM/ATR激酶磷酸化（形成γ-H2A.X），是脱帽端粒或未修复的DNA损伤引发的衰老的另一个标志物。培养细胞接近复制衰老时，γ-H2A.X阳性的频率急剧上升（***5***，***8***）。许多经销商都提供针对所有这些标志物的抗体。

(1) 室温下将细胞在1 mL溶于PBS的2%多聚甲醛溶液中孵育10 min（**注释2**）。

(2) 弃去多聚甲醛溶液并用PBS冲洗细胞2次。

(3) 透化处理：细胞与1 mL PBG-Triton在室温下孵育45 min（**注释3**）。

(4) 加入1/2000稀释（在PBG-Triton中稀释）的一抗。将细胞在室温下轻柔振荡孵育1 h（**注释4**）。

(5) 用PBG-Triton冲洗2次。

(6) 将细胞与结合荧光素的二抗（1/4000稀释于PBG-Triton）孵育45～60 min（**注释4**）。

(7) 用1×PBS冲洗两次后，将细胞在1×PBS中重悬至浓度约为10^6个/mL，并在488 nm激发光下用FACS分析。细胞群体由前向散射（FSC）连同侧向散射（SSC）的二维散点图来确定。凋亡细胞（下部FSC和上部SSC辨认，**参考文献*9***）和细胞碎片（下部FSC和下部SSC）被门控输出。FL1（如果使用不同的荧光团则为其他荧光通道）设定为对数型。用同型对照，设置FL1增益以获得最开始的10个细胞中的无染色细胞。分选门设定到无染色和染色细胞间的最小值，分选以每秒300个细胞开始。

2. 结合 BrdU 后固定细胞的分选

长期 DNA 复制缺失表现为无法结合如 BrdU 这样的核苷酸类似物，是判断细胞衰老最好的标准之一。在细胞群体水平，这一标志物显示出比衰老相关 β-半乳糖苷酶染色更强的特异性（***10***）。但 BrdU 的结合（更确切地说，是结合的缺失）对衰老细胞的阳性选择特异性较低，因为这部分可能包含大量只是暂时退出细胞周期的细胞。这一技术在低 pH 下牵涉 DNA 变性并会导致显著的 DNA 降解（**注释 5**）。

（1）生长中的细胞用 20 μmol/L 的 BrdU 处理 48 h（**注释 6**）。调节细胞密度，使这一阶段培养结束时细胞仍处于对数生长期。收集并计数细胞。

（2）细胞在 300 *g* 下离心 5 min，再在 1×无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 中清洗，然后重复离心 5 min。

（3）吸弃上清液并轻轻敲打试管使沉淀松散。边摇边逐滴加入 70%的冰乙醇直至终浓度为 100 μL/10^6 个细胞，然后在室温孵育 20 min 以固定细胞。

（4）将细胞在 1 mL 洗涤缓冲液中重悬并在 300 *g* 下离心 5 min。吸弃上清液，将沉淀在新配制的变性液中重悬至终浓度为 150 μL/10^6 个细胞。

（5）将细胞在室温下孵育 20 min 使其变性。

（6）将细胞在 1 mL 洗涤缓冲液中重悬并在 300 *g* 下离心 5 min。

（7）弃去上清液并在 0.5 mL pH 8.5 的 0.1 mol/L 硼酸钠中重悬沉淀，然后室温孵育 2 min 以中和残留的酸性物质。加入 1 mL 洗涤缓冲液并将细胞样品分装以备检测和对照。将其在 300 *g* 下离心 5 min 并吸弃上清液。

（8）在稀释缓冲液中稀释 FITC 标记的 AntiBrdU 单克隆抗体（PharMingen，cat. no. 33284X）或者 FITC 标记的 IgG 对照（Pharmingen，cat. no. 35404X），每 30 μL 的缓冲液加入 20 μL 抗体。

（9）将细胞在稀释的抗体中重悬，浓度为 50 μL/10^6 个细胞，然后室温避光孵育 30 min。加入 1 mL 洗涤缓冲液并将细胞在 400 *g* 下离心 5 min。

（10）吸弃上清液。这一步在 BrdU 孵育阶段的最后，细胞可以选用 PI 染色，会显示出细胞周期分布（**注释 7**）。染色或未染色的细胞要在 1 mL 1×不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 中稀释以备分析。

（11）以 488 nm 激发波长分析细胞。细胞群通过 FSC/SSC 二维散点图确定。BrdU 结合情况通过 FL1 测量，设为对数型。应用同型对照，设置 FL1 以获得最初 10 个细胞中的未染色细胞。分选门设置为未染色和染色细胞间的最小值。如果细胞被 PI 染色，可以选择性的用一个多边形的门在 FL1/FL 散点图中确定分选所得细胞。分选速度设置为每秒 300 个细胞。

4.3.3 活细胞分选

活细胞分选是理想的方法，因为它不限制任何的连续分析。但是，对于未经遗传修饰的衰老细胞不存在二元的标志物。这就意味着对分选门位置的选择和衰老细胞富集存在某种程度上的任意性。

1. 细胞大小和自发荧光

细胞增大长时间以来被认为是衰老细胞的一个特征（*11*）。FSC测量细胞大小已作为应用FACS从培养的无限增殖的成纤维细胞中分选衰老表型细胞群的一项指标（*12*）。细胞内容物中的脂褐素是不能降解的自发荧光的“衰老色素”，随时间推移而增多，这不但发生在终末不分裂细胞中，也存在于增殖中的细胞。这种增长会因细胞接近衰老而变快，可能由于氧化应激的上升导致脂褐素更快的积累，以及由于细胞周期迟缓，脂褐素进入子代细胞的“溶出”速度变慢（*13*）。将细胞大小和自发荧光（由FL-1测得）相结合作为分选参数就可以很好地分离活的衰老细胞和增殖细胞，多种衰老细胞标志物，如形态学、生长速率、衰老相关β-半乳糖苷酶，γ-H2A. X染色和BrdU结合的方法已经验证了这一点（*6*）。

(1) 胰蛋白酶处理对数增长期的细胞，4℃下在添加10%血清的DMEM中收集，然后立即用于在FACS分选机上分析和分选（**注释8**）。

(2) 未固定细胞的自发荧光在FL1下测量（对数型），在FSC下监测细胞大小。FSC测量可以使用线性或对数刻度（**图4.1**），但FSC用线性刻度可以获得更好的分辨率（**参考文献6**）。

(3) 活细胞群体通过FSC/SSC二维散点图确定，凋亡细胞和细胞碎片被输出（见4.3.2节1.小节）。分选门设定为FSC/FL1散点图。对于FSC和FL1二者来说，分别都要用上下四象限来分选衰老和年轻的增殖细胞，可以得到对分选群体更佳的分辨率（**图1**）并且更好地富集衰老细胞（*6*）（**注释9**）。

(4) 细胞以每秒100～300个细胞的速度分选，收集应于时置冰上。如果细胞必须浓缩，要用低速离心（转速$\leqslant 200\ g$）（**注释10**）。

2. 活细胞的ROS和MMP染色

早期和晚期的传代成纤维细胞线粒体功能不同，因而也导致了在氧化应激水平上的差异。应用荧光探针检测整个细胞内的ROS水平已显示出体外衰老与体内衰老同样与高水平的内源性ROS相关（*14*，*15*）。最近，我们使用荧光探针JC-1发现衰老细胞比增殖细胞有更低水平的膜电位（尚未发表的数据）。使用JC-1染色，Santos和同事用不同的线粒体膜电位分选细胞并分析分选所得群体的线粒体DNA损伤（*16*）。

(1) 胰蛋白酶处理对数增长期的细胞，在添加10% FCS的DMEM中收集，计数，用PBS洗1次，400 g 离心5 min。

(2) 弃上清液。

1) 过氧化物的DHR 123染色（**注释11**）

(1) 用5 mL含有15 μL DHR123储备液的无血清DMEM重悬细胞沉淀（见4.2节）（DHR123的终浓度为30 μmol/L）。

(2) 细胞在37℃避光孵育30 min。

(3) 孵育后离心细胞（400 g，5 min）并弃上清液。

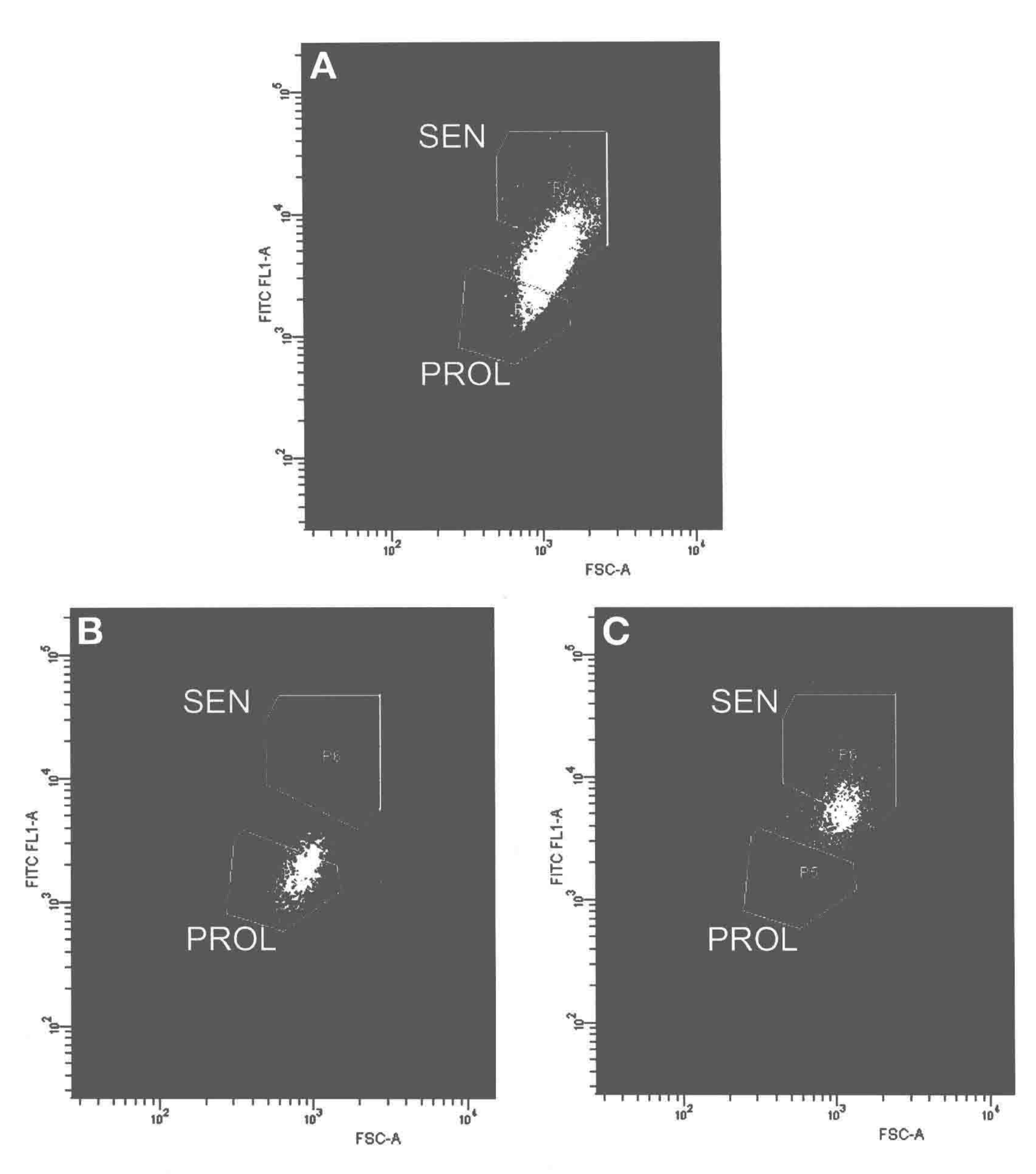


图 4.1　根据细胞大小（FSC-A）和脂褐素含量（FITC FL1-A）分选 MRC-5 成纤维细胞（PD34）
(A) 设置门控分选衰老细胞（SEN，P6），使得其含有在 FSC 和 FL1 通道显示最高值的全部细胞的 25%。同样，分选增殖中的细胞（PROL，P5）的门控包含在 FSC 和 FL1 通道显示最低值的全部细胞；(B) 对 PROL 中分选出的 MRC-5 细胞的再分析；(C) 对 SEN 中分选出的 MRC-5 细胞的再分析

(4) 沉淀在无血清的 DMEM 中重悬浮并立即用于分析和分选（**注释 2**）。

(5) 在 FSC/SSC 二维散点图下确定活细胞群体，而凋亡细胞和细胞碎片从分选中被排除（见 4.3.2 节 1. 小节）。分选门设为 FL1（对数型），可以方便地在 FSC/FL1 二维散点图下确定。对于 FL1，用左右象限来分选最高（高 FL1）和最低（低 FL1）的过

氧化物水平。

2) JC-1 染色确定 MMP（**注释 13**）

(1) 1×10^5 个细胞在 500 μL 无酚 RPMI 1640（Sigma）中重悬，然后加入 1 μL JC-1 储备液，达到 1 μg/mL 的终浓度。

(2) 37℃孵育细胞 30 min。

(3) 4℃下 300 *g* 离心细胞 5 min，收集沉淀，用冰的 PBS 洗涤，然后 4℃下将其在 200 μL PBS 中重悬。

(4) 用 FSC/SSC 二维散点图确定活细胞群体，而凋亡细胞和细胞碎片从分选中被排除（见 4.3.2 节 1. 小节）。FL1 和 FL3 设定为对数型，并且分选门在 FL3/FL1 散点图下确定。全部细胞的 4 个象限中，同时出现在最高 FL1 和最低 FL3 的将被浓缩，因为这些细胞有低的膜电位，也就是衰老细胞。相应地，有最低 FL1 和最高 FL3 的象限组成了线粒体膜电位最高的细胞。

(5) 为确保 JC-1 染色有效，建议使用对照样本，其中所有细胞的线粒体都已去极化。用可以瓦解 $\Delta\Psi$ 的药物处理细胞，如质子转位因子羰基氰化 *p*-（三氟甲氧基）苯腙（FCCP 20 μmol/L，30 min），会使荧光分布发生很大程度的改变。

4.4　注释

(1) 大多数流式细胞仪自身的清洗功能不能满足要求，再次分析之前，有必要彻底清洗流式细胞仪内的管道，以获得可靠的定量分析结果。我们依次使用 1 mL 1% 的 Triton，2 mL 蒸馏水，1 mL PBS 完成清洗。

(2) 这部分应用的大多数细胞核标志物或多或少都对可逆的生长停滞敏感，如某些满层贴壁或血清饥饿导致的可逆生长停滞。例如，p21 在可逆性停滞的 G_0 期细胞中升高。另外，有证据显示增殖细胞核抗原 PCNA 偶尔能够在脱离细胞周期的 G_0 期细胞中表达（***17***）。DNA 损伤位点的背景水平在 G_1 期略有升高，有可能是因为对停顿的复制叉的识别（***5***），但也有可能是在缺少血清的情况下受到抑制（***18***）。因此在分选取样时，细胞应该处于半铺满状态。

(3) 透化作用的条件（洗涤剂类型、孵育时间长短）必须根据所处理的细胞来校正。透化作用必须比免疫组织化学中的温和，以保持细胞在通过流式细胞仪时的完整性。最为理想的是细胞应在 FSC/SSC 下呈现出一个良好确定的群体，与此同时，透化作用应该可以有效地使抗体穿透。

(4) 这里的抗体稀释浓度仅作为一个例子，实际抗体浓度必须通过对每种细胞株和抗体的组合滴定得到。这里给出的浓度可以很好地用于 MRC-5 成纤维细胞，使用小鼠单克隆 γ-H2A.X（Upstate）和荧光素结合的二抗（AlexaFluor 594 Molecular Probes）。

(5) 在经过 BrdU 染色后，我们从 MRC-5 成纤维细胞中分离 DNA 并使用脉冲场凝胶电泳分析，只能获得严重降解的 DNA，因此所有后续的依赖高分子质量 DNA 的

分析都无法进行。

(6) 为了更高效地选择衰老细胞，BrdU 结合时间可以延长至 72 h。但是，长时间的 BrdU 处理具有细胞毒性。在细胞结合 BrdU 时一定要小心，避免细胞暴露于光下，因为这将增大 DNA 链断裂的产生。

(7) 对于 DNA 染色，需在室温下黑暗环境中将细胞置于 10 μg/mL PI 的 PBS 溶液中，孵育 30 min。每 10^6 个细胞使用 0.5 mL PI 溶液。

(8) 在生长停滞细胞中，脂褐素积累速率升高，因为细胞分裂时，含脂褐素的溶酶体在子细胞间的分配是最主要的逐渐降低脂褐素水平的途径之一。

(9) 如果仪器每次运行都谨慎地校准，在一个标准细胞群体中确定的门控位置可被用于不同实验以测量衰老和未衰老细胞间比率的变化（**参考文献 6**）。

(10) 分选细胞，包括在 PBS 中储存细胞的耗时很长（几个小时），分选本身也对细胞造成应激。在此过程结束时，人成纤维细胞对于切应力变得高度敏感，导致强力离心时损失大多数细胞。

(11) 在活细胞内，无色的二氢罗丹明 123（DHR）被氧化。例如，在过氧化物酶、铁和细胞色素 c 的存在下被过氧化氢氧化形成罗丹明 123。此外，DHR 也与过氧化亚硝酸盐反应。荧光产物在线粒体内积累，即使氧化发生在其他细胞器或是细胞质中。罗丹明 123 在 FL1（绿色）和 FL3（红色）通道都发荧光，但我们发现在 FL1 中探测更为敏感。

(12) 室温和环境光线下，DHR123 在人成纤维细胞中发出的荧光可保持相当恒定至少 1～2 h。如需更长的分选时间，细胞须 4℃避光保存。

(13) JC-1 探针在低浓度时作为绿色荧光单体存在，但在高浓度时形成聚集物，显现出宽的激发光谱，发射波长的最大值为 590 nm。JC-1 可在 488 nm 下激发并在二维模式下检测，绿色通道检测单体，红色通道检测聚集物。JC-1 的线粒体吸收依赖细胞膜电位，在更高的膜电位下具有更高的吸收（以及更高的红色荧光的可能性）。因此，FL3/FL1 的比率就成为了线粒体膜电位的指示标识。

参 考 文 献

1. Smith, J. R. and Whitney, R. G. (1980) Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. *Science* **207**, 82-84.

2. Kill, I. R., et al. (1994) The expression of proliferation-dependent antigens during the lifespan of normal and progeroid human fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 2)**, 571-579.

3. Thomas, E., et al. (1997) Different kinetics of senescence in human fibroblasts and peritoneal mesothelial cells. *Exper. Cell Res.* **236**, 355-358.

4. Bond, J. A., Wyllie, F. S., and Wynford-Thomas, D. (1994) Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* **9**, 1885-1889.

5. Fagagna, F. d. A. d., et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198.

6. Martin-Ruiz, C., et al. (2004) Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J. Biol. Chem.* **279**, 17, 826-17, 833.

7. Herbig, U., et al. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving

ATM, p53, and p21 (CIP1), but not pl6 (INK4a). *Mol. Cell.* **14**, 501-513.

8. Zglinicki, T. V., et al. (2005) Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 111-117.
9. Sgonc, R. and Gruber, J. (1998) Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.* **33**, 525-533.
10. Wei, W. and Sedivy, J. M. (1999) Differentiation between Senescence (M1) and Crisis (M2) in Human Fibroblast Cultures. *Exp. Cell Res.* **253**, 519-522.
11. Bayreuther, K., et al. (1988) Differentiation of fibroblast stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* **10**, 115-130.
12. Gorbunova, V., Seluanov, A., and Pereira-Smith, O. M. (2003) Evidence that high telomerase activity may induce a senescent-like growth arrest in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 7692-7698.
13. Sitte, N., et al. (2001) Lipofuscin accumulation in proliferating fibroblasts in vitro: an indicator of oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **36**, 475-486.
14. Hurter, E., et al. (2002) Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **37**, 1165-1174.
15. Allen, R. G., et al. (1999) Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J. Cell Physiol.* **180**, 114-122.
16. Santos, J. H., et al. (2003) Cell sorting experiments link persistent mitochondrial DNA damage with loss of mitochondrial membrane potential and apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 1728-1734.
17. Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the Known and the Unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311-322.
18. Satyanarayana, A., et al. (2004) Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5459-5474.

第5章　端粒长度分析

Telomere Length Analysis

Andrés Canela, Peter Klatt, Mzría A. Blasco

摘要　大多数长寿命的体细胞种系在其生命的整个过程中都要经历端粒的缩短，严重的端粒缩短将引起组织细胞生存能力的丧失，这与在衰老和衰老相关的疾病中组织功能的改变和再生能力的丧失相关联。因此，端粒长度是衰老的一个重要生物标志，而且可以用于对老龄化疾病的预后评估。鉴于这些事实，可以确定衰老过程中端粒长度的方法十分重要。自从传统的端粒 Southern 印迹法发展起来之后，对端粒长度定量的方法在准确性和灵敏度上已经有了极大的进展。这里我们介绍最近发展起来端粒长度定量的不同方法，也包括它们在衰老研究中潜在的应用前景。

关键词　端粒；端粒酶；老化；癌症；DNA 损伤

5.1　引言

5.1.1　端粒和端粒酶

端粒是位于真核细胞线性染色体末端顶部的核蛋白结构（*1*）。端粒由富含 G 碱基的 DNA 串联重复序列组成，在脊椎动物中为 TTAGGG，并且以 3′端富含 G 碱基的突出端为特征，能够折回并插入端粒的双链区域，形成所谓的 T-loop（*2*）。因为端粒保护染色体末端，防止其被识别为 DNA 损伤并被当作损伤处理，端粒过度缩短或功能丧失会引起 DNA 损伤应激反应从而导致细胞周期阻滞或凋亡（*3*～*5*）。

末端复制问题使得培养的正常人体细胞随着每次细胞分裂都经历端粒的缩短，导致端粒重复片段渐进性的损耗（*1*）。端粒酶是一种能够重新合成端粒重复序列的酶，在表达它的细胞中可以弥补末端复制问题（*7*）。大多数体细胞组织中缺乏端粒酶，但端粒酶却会出现在 90%以上的人类肿瘤中。长寿命物种的组织稳态通过细胞分裂来维持，因此，在缺乏端粒酶的情况下，机体组织细胞端粒的渐进性缩短会导致端粒功能丧失的细胞不断积累，最终危及到正常的组织功能（*8*）。尽管端粒酶活性的表达处于合适的水平，处于高度增殖的组织随着衰老亦会经历端粒的缩短（*9*～*12*）。与之相反，端粒的缩短在增殖较低的组织中几乎不发生。例如，骨骼肌（*13*）或是端粒酶活性高的组织中，如男性的精子细胞（*14*）。严重缩短的端粒与年龄相关疾病的出现有关联，如血管性痴呆、动脉硬化和癌症（*15*～*17*）。

端粒酶缺陷型的小鼠模型已作为探究端粒缩短所引发生物学结果的工具建立起来。

端粒缺失鼠（$Terc^{-/-}$）通过敲除编码鼠科动物 *Terc* 基因而获得（***18***）。因为端粒酶活性在大多数成年人体细胞组织中是缺乏的，携带短端粒的 $Terc^{-/-}$ 小鼠已经成为研究端粒驱动的人类衰老问题的一个十分有用的模型。$Terc^{-/-}$ 小鼠随着代数增长表现出渐进性的端粒缩短，而且由于端粒的耗尽和染色体末端融合增多，只能得到有限数量的增殖后代（***18～20***）。在 $Terc^{-/-}$ 小鼠体内与端粒功能紊乱相关联的病理过程会影响大多数的小鼠组织，如生殖系、内脏、皮肤、免疫系统、骨髓、肝脏、心脏和血管。这些小鼠的疾病状态以细胞增殖的减少和凋亡的增加为特征（***19～26***）。这些观察现象都支持了"端粒长度是限制躯体组织复制能力的有丝分裂时钟"这一概念（***27***）。在此背景下，端粒长度可能是衰老和衰老相关的病理过程中的一个重要的标志物。

最为广泛使用的端粒长度分析的方法是端粒限制性片段分析（TRF），或端粒的Southern印迹法（***28***）。但是这种方法也存在多方面的缺陷（之后讨论），它促使了其他测量端粒长度的方法的发展，如基于荧光的原位杂交（FISH）。更新近发展起来的还有一些其他的方法，如杂交保护检测（***29***）、杂交检测（***30***）和引物原位杂交（PRINS）（***31***），同时还有基于PCR的方法［STELA和定量PCR（***32***）］。这里我们集中讨论TRF和FISH方法的应用。

5.1.2　端粒限制性片段分析

第一种测量端粒长度的方法基于Southern印迹法杂交，使用针对端粒重复序列的探针（***33～35***）。端粒限制性片段分析，也称作端粒的Southern印迹法，依赖于限制性酶对基因组DNA的差异消化。限制性酶都不会消化端粒的重复序列，因此，频繁地用限制性酶消化基因组DNA会将基因组DNA消化为短的片段，留下大批完好的端粒，即所谓的端粒限制性片段。接下来用凝胶电泳分离基因组片段，并通过带有端粒探针的Southern印迹法鉴定含有端粒的片段，TRF的平均大小反映了样品端粒的平均长度（**图5.1**）。为了将此技术应用于带有长端粒的生物体样品中，如近交实验室小鼠，需要将细胞嵌入加有蛋白酶和限制酶的琼脂糖胶块中消化，并用脉冲场凝胶电泳解析TRF（***35***）。

TRF分析已经成为标准的且最为普遍的端粒长度分析方法。TRF分析的优点在于：①它是广为人知且广泛应用的端粒长度研究技术。②它对试剂和仪器无特殊要求。③它可以作用于多种多样的样品，包括基因组DNA、培养的细胞还有组织（有些需要分离细胞核）。④结合脉冲琼脂糖凝胶电泳，可以测量很大范围的端粒长度。除此之外，这种方法还可用于测量端粒的G链突出端（***36***）。但是，TRF分析也有非常多的缺陷：①耗时，难于量化，并且需要大量细胞（10^5 个以上）。②只能获得整个样品端粒长度的平均值，既不能分辨单个端粒也不能分辨单个细胞内端粒的平均长度。③由于短片段在电泳迁移中不集中且杂交信号弱，无法检测到短的端粒，而短端粒在衰老研究中非常重要。④TRF不但包含端粒，还有一些亚端粒的序列，其长度多样，取决于给定的染色体臂上最后的限制性位点（**图5.1A**），因此会增加TRF的差异性并且掩盖TTAGGG重复序列的真实长度。

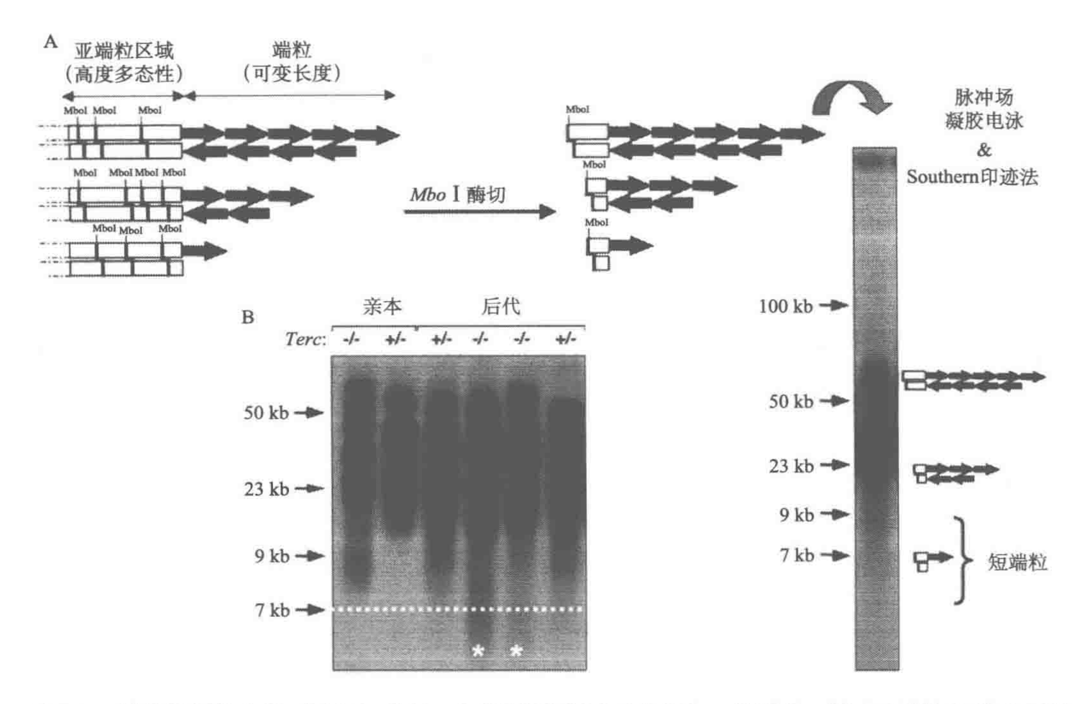


图 5.1　端粒限制性片段（TRF）分析。A 图说明了 TRF 分析的一般原理。图示亚端粒和端粒区域，分别由白色方块和黑色箭头表示。基因组被 *Mbo*I 剪切，留下完整的端粒和一些邻近的到第一个 *Mbo*I 酶切位点为止的亚端粒序列。被酶切的 DNA 包含 TRF，如正文中所述进行脉冲场电泳和 Southern 印迹法。TRF 是通过与^{32}P 标记的端粒探针杂交来检测，以此获取全部端粒长度的分布来分析小鼠胚胎成纤维细胞内的情况。B 图显示了对晚代端粒酶缺陷型（$Terc^{-/-}$）小鼠和端粒酶杂合子（$Terc^{+/-}$）小鼠及其后代的骨髓细胞的 TRF 分析结果。星号指示小于 7 kb 的 TRF 片段，具体实验详见正文

5.1.3　荧光原位杂交法

端粒长度分析随着 FISH 方法的发展而大幅进步（***37***）。与 TRF 相比，FISH 方法有更高的灵敏度、特异性和确定性。这种方法可以对单细胞水平的单独的染色体的端粒长度进行测量，在自然组织匀浆和组织切片上均可应用。FISH 端粒长度分析基于荧光肽核酸（PNA）寡核苷酸探针的特异性标记（***37***）。PNA 探针是 DNA 同源的合成肽链，其中 DNA 带负电的磷酸戊糖骨架被不带电的 *N*-2 胺乙基甘氨酸骨架所取代（***38***）。这样的修饰产生了非常稳定高效的针对靶 DNA 的特异性杂交（***39***）。因为与特定端粒杂交的端粒 PNA 探针发出的荧光信号强度与端粒长度直接相关，所以这种方法可以精确测量端粒长度（***40***）。测量端粒长度的 FISH 方法可以分为两组，分别称为定量（Q）-FISH（基于数字荧光显微镜），以及 Flow-FISH（基于流式细胞仪）。

1. 定量荧光原位杂交（图 5.2）

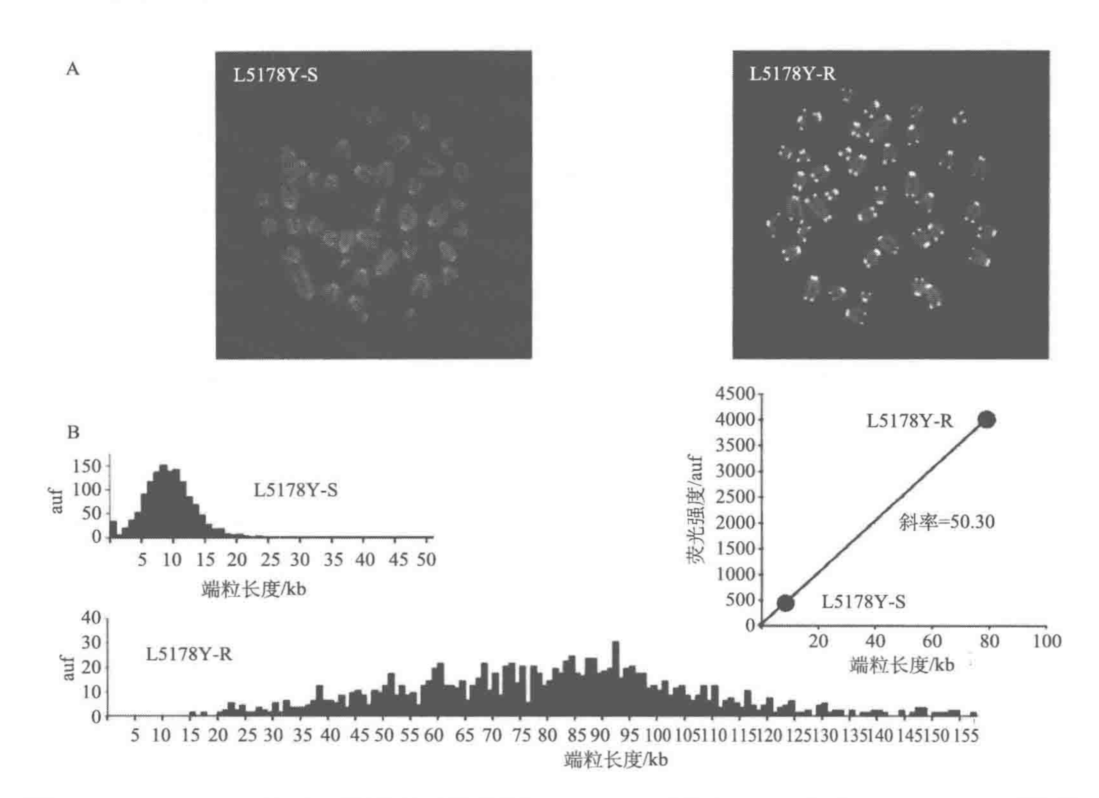


图 5.2　Q - FISH 分析。**A 图**显示处于分裂中期的 L5178Y-S 和 L5178-R 细胞，平均端粒长度分别为 10 kb 和 79 kb。染色体和端粒被 DAPI 着色（蓝色），端粒 PNA 探针被 Cy3 标记［黄色（伪色）］。**B 图**显示了 L5178Y-S 细胞和 L5178-R 细胞端粒长度的分布直方图，使用 TLF-TELO 软件处理类似图 A 的图像而获得。插图是用 L5178Y-R 和 L5178Y-S 细胞分裂中期的任意荧光单位（auf）相对这些细胞已知的平均端粒长度（分别为 79 kb 和 10 kb）作图所获得的标准曲线

Q-FISH 测量端粒长度基于数字化荧光显微技术的应用，是用荧光 PNA 端粒探针杂交中期细胞之后测定端粒荧光的方法（***37***，***41***，***42***）。通过捕捉单个的端粒荧光信号，Q-FISH 测量中期细胞的所有端粒的长度，从而获得所有端粒长度的分布频率。由于中期细胞的端粒（使用 Cy3 标记的端粒 PNA 探针）和染色体（使用 DAPI 染色）都可以被染色，所以分析获得的图像可以得到每对染色体和染色体臂上端粒长度分布的信息（***40***）。因此，与 TRF 分析法相反，Q-FISH 技术可用于测量每个单独的染色体末端的端粒长度。检测值下限能够低至 0.15 kb 以下，可以对“无信号末端”，即带有极短端粒（< 0.15 kb）的染色体末端的数量作出定量（***37***，***40***）。这种方法特别适用于衰老研究，因为它更加清晰地显示出严重缩短端粒（无信号末端）的频率，而不仅仅是端粒的平均长度，对端粒功能紊乱、细胞生存力丧失和继发的年龄相关的病理过程的出现具有决定性意义（***43～45***）。Q-FISH 方法与 TRF 分析法相比较，具有更高的准确性，因为端粒重复序列的量与检测到的荧光信号之间有直接联系。此外，Q-FISH 比 TRF

分析法需要更少的样品。一般而言，分析 20 个中期细胞就足以提供精确的端粒长度测量，而 TRF 分析需要至少 10^5 个细胞。

Q-FISH 技术的缺陷在于：①现有形式耗时且工作强度大；②需要相当昂贵且技术要求高的荧光显微成像系统；③它获取的是直接读出的单位值（整合荧光强度值），这样为获得端粒的绝对长度值，还需要使用带有确定长度端粒重复序列的质粒（***46***）或可以稳定维持已知端粒长度分布的细胞系（***47***）进行外部校准；④依赖中期相的细胞，所以只限于增殖活跃的培养细胞，而不能应用于终末不分裂细胞、已分化细胞或衰老细胞。

分裂间期细胞的 Q-FISH 方法的发展（***48***，***49***）避免了培养细胞的局限性，鉴定端粒长度不但可以使用石蜡包埋或冰冻组织切片，也可以使用刚分离的细胞。在两种方案中，Q-FISH 都可以与免疫染色技术相结合，同时鉴定端粒长度和其他参数，如 DNA 损伤或衰老标志物（***50***）。间期 Q-FISH 测量的一个缺点在于无法测量单个染色体上的端粒信号，因而无法对无信号末端进行定量。

2. 流式荧光原位杂交

Flow-FISH 方法对端粒的定量基于荧光活化的细胞分选（FACS）技术对单个间期

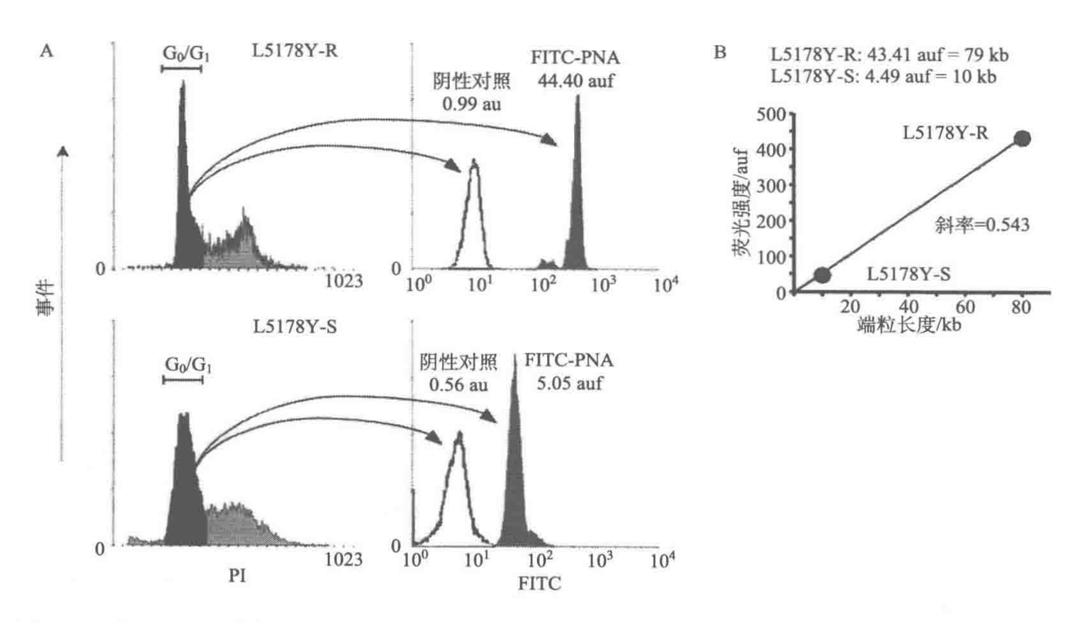


图 5.3　Flow-FISH 分析。**A 图**的左半部分显示 L5178Y-R 细胞（上图）和 L5178Y-S 细胞（下图）经碘化丙啶（PI）染色后的细胞周期的结果。在 G_0/G_1 期和 G_2/M 期群体分别用黑色和灰色的阴影表示。**A 图**的右半部分显示相应的 L5178Y-R 细胞（上图）和 L5178Y-S 细胞（下图）的 G_0/G_1 期群体的 FACS 结果。绿色峰为异硫氰酸荧光素标记的端粒 PNA 探针染色得到的图像，白色峰为未作荧光探针处理的对照组细胞的图像。**B 图**显示将 Flow-FISH 分析得到的 L5178Y-R 和 L5178Y-S 细胞的任意荧光单位（auf）（**A 图**）相对这些细胞已知的平均端粒长度（分别为 79 kb 和 10 kb）作图而获得的标准曲线

细胞内端粒荧光的捕获（***51***，***52***）。在 Flow-FISH 技术中，细胞悬液与端粒的荧光素 FITC 结合的 PNA 探针杂交，并复染 DNA，将 DNA 含量归一化。流式细胞术获取样品，通过每个被计数的细胞中的任意荧光单位得出端粒长度。根据细胞群的周期分布，得到两个端粒荧光信号，一个来自处于 G_2/M 期（4N DNA 含量）的细胞，一个来自处于 G_0/G_1 期（2N DNA 含量）的细胞。使用 G_0/G_1 期的细胞群将 DNA 归一化以补偿不同样品间 DNA 含量变化。与 Q-FISH 一样，为了获得端粒长度的绝对值，需要使用可以稳定维持一个已知的明确端粒长度分布的细胞系进行外部校准（**图 5.3**）。

Flow-FISH 是强大的高通量分析端粒长度的方法，拥有潜在的临床应用价值，因为：①FACS 技术简便且可实现自动化，拥有高通量技术的所有特质。②这项技术是定量的，可重复的，且是精确的。③Flow-FISH 端粒分析可与细胞表面标志物的检测相结合（***53***，***54***）。Flow-FISH 方法的限制性在于：①它的应用局限于分离的细胞。②大多数现成的 Flow-FISH 实验方案都集中在对血液细胞的分析。③这项技术需要专门的昂贵设备（流式细胞仪和分选机）。④与可以给出短端粒存在信息的 Q-FISH 方法相反，Flow-FISH 测量仅给出每个细胞中全部端粒长度的平均值。⑤染色体内端粒信号的存在可能引起对端粒长度的高估。

5.2 材料

5.2.1 TRF 分析

1. 试剂

（1）磷酸盐缓冲液（PBS：137 mmol/L NaCl，2.7 mmol/L KCl，4.3 mmol/L Na_2HPO_4，1.4 mmol/L KH_2PO_4，pH 7.3）。

（2）1.5 mL Eppendorf 管（Eppendorf AG，Hamburg，Germany）。

（3）2%（*m*/*V*）低熔点制备级琼脂糖（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA），溶于 PBS。

（4）蛋白激酶 K 溶液：20 mg/mL 蛋白激酶 K（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）溶于含 1 mmol/L EDTA、0.3 mol/L 乙酸钠和 0.2%（*m*/*V*）十二烷基硫酸钠（SDS）的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中（pH 8.0）。分装并－20℃保存。蛋白激酶 K 工作液要现用现配，用同样的缓冲液将蛋白激酶 K 储备液稀释 10 倍至 2 mg/mL。

（5）TE 1×缓冲液：含有 1 mmol/L EDTA 的 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）。

（6）100 mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF；Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）在异丙醇中。分装并－20℃保存。

（7）*Mbo*I 限制酶和 *Mbo*I 10×缓冲液（New England Biolabs，Ipswich，MA）（**注释 1**）。

（8）脉冲电场鉴定的琼脂糖（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（9）TBE 1×缓冲液：89 mmol/L Tris-碱，89 mmol/L 硼酸，2 mmol/L EDTA 溶于水。

（10）标准分子质量DNA：ProMega-Marker Lambda ladders（Promega，Madison，WI），5 kb大小的标准DNA（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA），1 kb标准DNA（Invitrogen，Carlsbad，CA）。

（11）低熔点SeaPlaque琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，MA）。

（12）溴化乙锭储备液10 mg/mL（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（13）变性液：1.5 mol/L NaCl和0.5 mol/L NaOH溶于水。

（14）中性液：1.5 mol/L NaCl溶于0.5 mol/L Tris-HCl缓冲液（pH 7.5）。

（15）SSC 2×：0.3 mol/L NaCl溶于0.03 mol/L枸橼酸钠缓冲液（pH 7.0）。

（16）Hybond-N^+尼龙膜（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ）。

（17）HIGH缓冲液：1%（*m/V*）牛血清白蛋白（BSA），0.2 mol/L磷酸钠，15%（*m/V*）甲酰胺，1 mmol/L EDTA，7%（*m/V*）SDS溶于水。

（18）^{32}P-标记的端粒探针：一个随机引物标记的1.6 kb（TTAGGG）$_n$序列片段，通过限制性的pNYH3 1.6质粒获得［由Dr. T. de Lange赠与（***46***）］，或T4多核苷酸激酶标记的（TTAGGG）$_4$或（CCCTAA）$_4$寡核苷酸。

（19）高严格度洗液：0.2×SSC（由试剂15稀释），添加0.1%（*m/V*）SDS。

以上所列的试剂是对培养的细胞或通过消化软组织获得的分离的细胞进行TRF分析所需的。当组织不能被消化为离散的细胞时，还额外需要如下所列的试剂来提取细胞核。

（20）溶液1：15 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）加入60 mmol/L KCl，15 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L精胺，0.15 mmol/L亚精胺，14 mmol/L β-巯基乙醇，2 mmol/L EDTA和0.3 mol/L蔗糖（4℃保存）。

（21）溶液2：15 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）加入60 mmol/L KCl，15 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L精胺，0.15 mmol/L亚精胺，14 mmol/L β-巯基乙醇，1mmol/L EDTA和1.37 mol/L蔗糖（4℃保存）。

（22）溶液3：15 mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）加入60 mmol/L KCl，15 mmol/L NaCl，0.5 mmol/L精胺，0.15 mmol/L亚精胺，14 mmol/L β-巯基乙醇，1 mmol/L EDTA（4℃保存）。

（23）2%（*m/V*）制备级低熔点琼脂糖（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）于溶液3（试剂22）中。

2. 仪器和用品

（1）Bio-Rad CHEF一次性插头模具（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（2）CHEF-DR Ⅱ 脉冲场电泳系统（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（3）标准凝胶铸台（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（4）带有Quantity-One软件的Gel-doc 2000系统（Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA）。

（5）UVC 500紫外（UV）交联器（Hoefer Inc.，San Francisco，CA）。

（6）适用于^{32}P-放射性自显影的底片，如Kodak X-OMAT（Kodak，Rochester，

NY)。它代替了传统的放射性自显影技术，用磷光屏探测^{32}P-标记的 TRF，使用带有磷光屏的 Storm 820 Phosphorimager，并需要 ImageQuant 软件（Molecular Dynamics，Amershan Biosciences，Piscataway，NJ)。

以上所列的试剂是对培养的细胞或通过消化软组织获得的离散的细胞进行 TRF 分析所需的。当组织不能被消化为分离的细胞时，还需额外使用如下所列的设备。

(7) 组织匀浆器 Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik，Staufen，Germany)。

(8) 带有水平转子的低温高速离心机和 10 mL 管。

(9) 无菌纱布和注射器。

5.2.2　Q-FISH 分析

1. 试剂

(1) Colcemid Karyomax 10 μg/mL (Invitrogen，Carlsbad，CA)。

(2) 磷酸盐缓冲液 (PBS)。

(3) 胰蛋白酶-EDTA：0.05%胰蛋白酶 (Invitrogen，Carlsbad，CA)。

(4) 低渗溶液：0.03 mol/L 枸橼酸钠溶于水，预热至 37℃（**注释 2**）。

(5) 甲醇-乙酸固定液：用 3 体积甲醇和 1 体积冰醋酸混合现制。

(6) 100%甲醇。

(7) 4% (*V/V*) 甲醛溶于 PBS。

(8) 酸化的胃蛋白酶溶液：1 mg/mL 胃蛋白酶 (Sigma-Aldrich，St. Louis，MO) 溶于 10 mmol/L HCl，预热至 37℃。

(9) 乙醇 (100%)。

(10) 90% (*V/V*) 乙醇，溶于水。

(11) 70% (*V/V*) 乙醇，溶于水。

(12) 去离子的甲酰胺：在甲酰胺 (ultra-pure from Fluka，经销商为 Sigma-Aldrich，St. Louis，MO) 中不断搅动 10% (*m/V*) AG 501X8 树脂 (20～50 目，Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA) 1～2 h。过滤除去树脂，分装后−20℃保存，避免反复冻融。

(13) Cy3 标记的 $(CCCTAA)_3$PNA 端粒探针 (Appied Biosystems，Foster City，CA)：制备冻干的分装品每个 5 μg，−20℃保存。使用前用 200 μL 的双蒸水重组，以获得 25 μg/mL 的储备液，4℃保存（**注释 3**）。

(14) 杂交液：10 mmol/L Tris-HCl (双蒸水中，pH 7.0) 含有 70% (*V/V*) 去离子的甲酰胺，0.25% (*m/V*) 封闭试剂用于核酸杂交和检测 (Roche，Basel，Switzerland)，5% (*V/V*) $MgCl_2$ 缓冲液 (25 mmol/L $MgCl_2$，9 mmol/L 柠檬酸，82 mmol/L $NaHPO_4$)，和 0.3 μg/mL Cy3-PNA 端粒探针。

(15) 漂洗液 1：70% (*V/V*) 甲酰胺于 10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2) 中，加入 0.1% (*m/V*) 的 BSA (Sigma-Aldrich，St. Louis，MO)。

(16) 漂洗液 2：0.1 mmol/L 含有 0.15 mol/L NaCl 和 0.08% (*V/V*) Tween-20

(Sigma-Aldrich，St. Louis，MO) 的 Tris-HCl (pH 7.2)。

(17) DAPI 溶液：混合 2～3 体积的"用于荧光的 Vectashield 封片液"(不含 DA-PI) 和 1 体积的"用于荧光的 Vectashield 封片液"(含有 DAPI) (都来自 Vector Laboratories，Burlingames，CA) (**注释 4 和 5**)。

(18) 封片剂。

(19) 校准珠：羧基修饰的乳胶 Fluospheres，直径 0.2 μm (Invitrogen Molecular Probes，Carlsbad，CA) (**注释 6**)。

(20) Slow Fade Antifade 试剂盒 (Invitrogen Molecular Probes，Carlsbad，CA) (**注释 6**)。

(21) 二甲苯 (只有石蜡切片操作时需要)。

2. 仪器和用品

(1) 标准的细胞培养仪器和用品。

(2) 台式搅拌仪。

(3) 玻璃巴斯德移液管。

(4) 载玻片和盖玻片。

(5) 玻片染色缸。

(6) 加热板。

(7) FISH 图像捕获系统 (5.3.2 节 1. 小节中将详述)。

5.2.3 Flow-FISH 分析

1. 试剂

(1) 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS。

(2) 去离子的甲酰胺：在甲酰胺 (ultra-pure from Fluka，经销商是 Sigma-Aldrich，St. Louis，MO) 中不断搅动 10% (*m/V*) AG 501X8 树脂 (20～50 目，Bio-Rad Laboratories，Hercules，CA) 1～2 h。过滤除去树脂，分装后－20℃保存，避免反复冻融。

(3) FITC 标记的 $(CCCTAA)_3$PNA 端粒探针 (Appied Biosystems，Foster City，CA)：制备冻干的分装品每个 10 μg，－20℃保存。使用前用 100 μL 的双蒸水重组，以获得 100 μg/mL 的储备液，4℃保存 (**注释 3**)。

(4) 杂交缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)，含有 70% (*V/V*) 去离子的甲酰胺，1% (*m/V*) BSA 以及 0.3 μg/mL 的 FITC-PNA 端粒探针。作为阴性对照，使用不含 FITC-PNA 端粒探针的杂交缓冲液。

(5) 漂洗液 1：20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.2)，含有 70% (*V/V*) 去离子的甲酰胺，0.1% (*m/V*) BSA 以及 0.1% (*V/V*) Tween-20。

(6) 漂洗液 2：加入 0.1% (*m/V*) BSA 和 0.1% (*V/V*) Tween-20 的 PBS。

(7) PI 溶液：加入 0.1% (*m/V*) BSA、10 μg/mL RNase 以及 0.1 μg/mL 碘化丙啶 (Sigma-Aldrich，St. Louis，MO) 的 PBS。

2. 仪器和用品

(1) 流式细胞仪和流式细胞仪的用品（5.3.3 节中将详述）。

(2) 加热混匀器（Eppendorf AG，Hamburg，Germany）。

5.3 方法

5.3.1 TRF 分析

1. 样品制备

1) 培养细胞和通过消化软组织获得的离散细胞的实验方案

(1) 新收获的细胞（1.5×10^6 个）在 PBS 中重悬，室温下在桌面离心机 2500 *g* 离心沉淀，用 PBS 洗涤 2 遍，然后再次离心沉淀。将细胞沉淀在液氮中急冻并储存于 −80℃备用。

(2) 制备琼脂糖块（下文讨论）之前，细胞沉淀在 50 μL PBS 中重悬，50℃孵育 5 min。

(3) 加入 50℃预热的 Bio-Rad 制备级低熔点琼脂糖［2%（*m/V*）于 PBS 中］50 μL。

(4) 混合均匀并在 50℃下再孵育 5 min。

(5) 接着如下文中所述制备琼脂糖胶块。

2) 对不能被消化为离散细胞的组织的实验方案

(1) 新鲜分离的组织样品在液氮中急冻并储存于−80℃备用。

(2) 用组织匀浆器将一片冰冻组织（足够分离 2×10^6 个细胞核）在 3 mL 溶液 1 中重悬（避免样品受热）。

(3) 用装有 3～4 层无菌纱布的 5 mL 注射器过滤组织匀浆。

(4) 将滤好的匀浆铺在 5 mL 溶液 2 上。

(5) 4℃下 20 000 *g* 使用水平转子离心 15 min。

(6) 在 1 mL 溶液 1 中将胞核沉淀物重悬，计数细胞核并分装 1.5×10^6 个细胞核供之后的检测。

(7) 用桌面离心机 5000 *g* 离心 10 min 沉淀细胞核。

(8) 在 50 μL 溶液 3 中重悬沉淀的细胞核并在 50℃下孵育 5 min。

(9) 加入 50 μL 预热至 50℃的 Bio-Rad 制备级低熔点琼脂糖溶液［2%（*m/V*）在溶液 3 中］。

(10) 混合均匀并在 50℃下孵育 5 min。

(11) 接着如下文中所述制备琼脂糖胶块。

2. 制备琼脂糖胶块（注释 7）

（1）转移预热过的（50℃）含有细胞或分离的细胞核的琼脂糖溶液到 Bio-Rad CHEF 一次性模具，室温下冷却 5 min，然后 4℃下再冷却 15 min。

（2）转移胶块到 1.5 mL Eppendorf 微量离心管中。

（3）加入 500 μL 蛋白激酶 K 工作液（2 mg/mL）并在 50℃下孵育过夜。

（4）用 1×TE 冲洗胶块 2 遍，每遍 1 h，接下来用含 PMSF（1 mmol/L）的 1×TE 洗 1 次（1 h），使蛋白激酶 K 失活，最后再用 1×TE 洗 1 次（1 h）。

（5）胶块可以在 4℃下保存于 1×TE 中备用。

3. *Mbo* Ⅰ 限制性消化（注释 1）

（1）在摇床上于 1 mL H_2O 中洗涤琼脂糖胶块 1 h（见 5.3.1 节 2. 小节）。

（2）在摇床上于 1 mL 1×的 *Mbo* Ⅰ限制性缓冲液中平衡胶块 1 h。

（3）在 300 μL 含有 50 U *Mbo* Ⅰ的 1×*Mbo* Ⅰ缓冲液中 37℃孵育过夜。

4. 脉冲场电泳

（1）在摇床上于 500 μL 蒸馏水中洗涤琼脂糖胶板 30 min（见 5.3.1 节 2. 小节）。

（2）在 0.5 mL 的 0.5×TBE 中平衡胶板 60 min。

（3）制备 1%的琼脂糖凝胶（BioRad 经脉冲电场验证的琼脂糖）在 250 mL 的 0.5 × TBE 中，使用 Bio-Rad 标准凝胶铸台。

（4）在电泳之前，在脉冲场电泳槽中循环大约 3 L 0.5×TBE 30 min。

（5）将胶板切成等大的几块，将其中一块加到凝胶上。剩下的凝胶块可以在 4℃下保存在 1×TE 中备在之后电泳中使用。上样琼脂糖中点样标准分子质量 DNA，并盖住除了标准分子质量 DNA 中用到的几个槽以外所有的槽，带有低熔点 SeaPlaque 琼脂糖（1% 在 0.5×TBE 中），让琼脂糖凝固。

（6）在脉冲电场小室中固定凝胶，并上样液体型标准分子质量 DNA（**注释 8**）

（7）跑胶 1 h，不需要再循环，直到标准分子质量 DNA 已经进入凝胶，然后按如下参数设置系统：初始脉冲，5 s；终止脉冲，5 s；电流，6 V/cm^2；跑胶时间，23 h（对小鼠细胞）或 18 h（对人类细胞）。

（8）1 h 后，重新开始电泳缓冲液的循环，设置冷却模块为 14℃。继续进行电泳［**步骤（7）**］。

（9）电泳后，将凝胶取出，在 1 L 加入 50 μL 溴化乙锭储备液（10 mg/mL）的 0.5×的 TBE 中室温染色 20 min，同时轻轻搅动（**注释 9**）。

（10）在 0.5×TBE 中简单冲洗凝胶，在 UV 光下紧贴标尺显影（之后需要标尺对端粒大小进行定量）。

（11）在变性液中冲洗凝胶 3 遍，每遍 30 min，同时轻轻搅动。

（12）在中和液中冲洗凝胶 3 遍，每遍 30 min，同时轻轻搅动。

（13）在 2×SSC 中平衡凝胶 5 min。

5. Southern 印迹法

（1）在 2×SSC 中湿法转移凝胶到 Hybond-N^+ 尼龙膜上过夜。

（2）UV-交联 DNA 至膜，120 mJ/cm^2。

（3）用 HIGH 缓冲液 65℃下预杂交膜 1 h。

（4）加入（TTAGGG)$_n$ 端粒探针到预杂交溶液中，65℃杂交过夜。当使用（TTAGGG)$_4$ 或（CCCTAA)$_4$寡核苷酸探针时，如**注释 9** 所述操作预杂交和杂交。

（5）用预热的（65℃）漂洗液洗膜 3 遍 30 min。

（6）用 Kodak X-OMAT 底片让膜自显影，或者也可选择将膜暴露于磷光屏 30 min 或过夜，用 ImageQuant 软件在 Storm 820 PhosphorImager 上显影。

6. 数据分析

每个样品的平均 TRF 长度可以通过对放射性自显影图像或 PhosphorImager 图像进

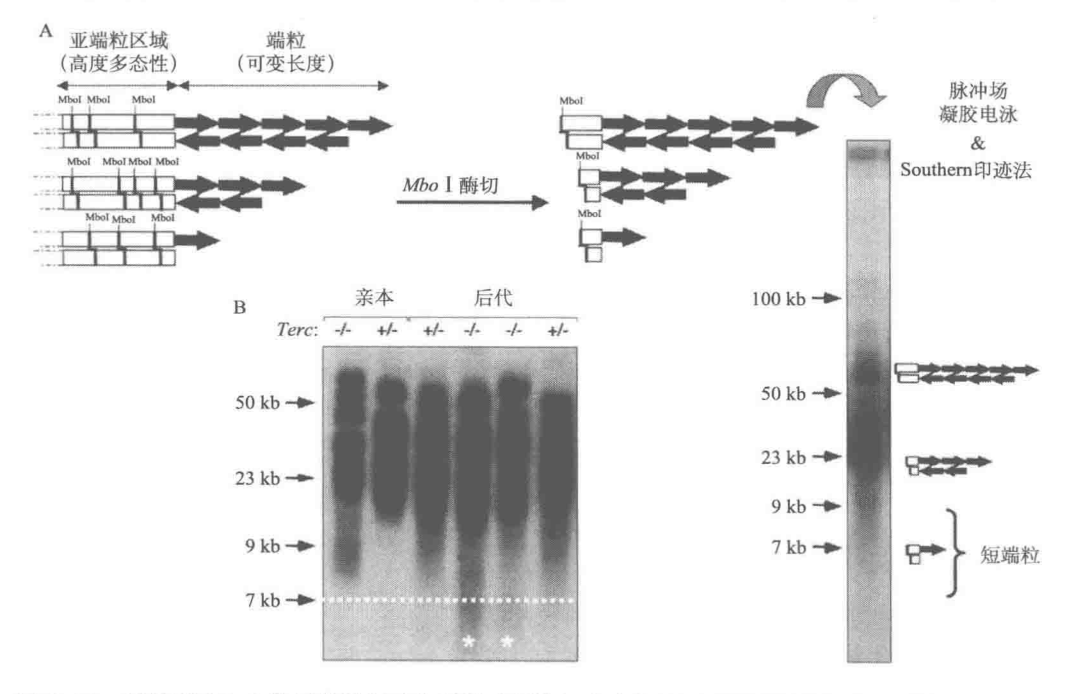


图 5.4A　示使用 *Mbo* I 从原代鼠科动物胚胎成纤维细胞消化基因组 DNA 进行 TRF 分析，并进行脉冲场电泳和 Southern 印迹法的一般原理。将消化的 DNA 与^{32}P 标记的端粒探针杂交获得的涂片，与所分析的细胞的整个端粒长度的分布相对应。光密度测定和与标准分子质量参照物的位置相对照可以得出对平均端粒长度的估计（约 30 kb）并提供短端粒（$<$ 9 kb）存在的信息。**图 5.4B** 示如何在晚期端粒酶缺陷（Terc$^{-/-}$）小鼠中通过与 Terc$^{+/-}$ 小鼠杂交影响后代端粒长度，从而向种系中再次引入端粒（***43***）。TRF 分析显示了存在于雄性 Terc$^{-/-}$ 小鼠中，而不存在与雌性 Terc$^{+/-}$ 小鼠中的低分子质量 TRF（$<$9 kb）。在后代中，从母本得到无 Terc 的等位基因的小鼠比同窝的得到野生型等位基因的小鼠表现出更加缩短的端粒，这已被低于 7 kb 的 TRF 的存在所证明，而后者有更长的端粒，低分子质量 TRF 明显高于 7 kb

行光密度分析获得，使用 GelDoc 2000 系统提供的 Quantity-One 和 Storm 820 PhosphorImager 提供的 ImageQuant 软件包。请注意，对于详细地将亚端粒考虑在内的 TRF 信号强度分析，Microsoft Excel® 表格程序“Telorun”（***56***）可以在 Shay 和 Wright 实验室的主页上获得（http://www. swmed. edu/home _ pages/cellbio/shay-wright/reseach/sw _ lab _ methods. htm）。

5.3.2 Q-FISH 分析

1. Q-FISH 分析中期相

1）中期相的制备

（1）对于中期相的制备，铺板适当数目的细胞以便它们能够在开始制备样品时达到接近满层，这时分裂中细胞数目达到最大。为了使培养的细胞接近满层并活跃分裂，加入终浓度为 0.1 μg/mL 的秋水仙胺使细胞停滞于中期（**注释 10**）。

（2）轻度离心（400 *g*）收获悬浮细胞，胰蛋白酶消化收获贴壁细胞（**注释 11**）。

（3）轻度离心使沉淀细胞（400 *g*）。

（4）用 PBS 冲洗细胞。

（5）轻度离心使沉淀细胞（400 *g*），吸弃上清液，留下 1 mL 上清液重悬细胞。

（6）用玻璃巴斯德移液管，在不断轻轻混匀的同时，逐滴加入 9 mL 预热（37℃）的低渗液。

（7）37℃水浴中孵育 25 min（**注释 12**）。

（8）轻度离心使细胞沉淀（400*g*），吸弃上清液，留下 1 mL 上清液重悬细胞。

（9）用玻璃巴斯德移液管，在不断轻轻混匀的同时，逐滴加入 9 mL 新制的甲醇-乙酸酸性固定液。

（10）重复**步骤（8）**和（**9**）2 遍（沉淀和固定细胞）。固定后的细胞可无限期储存于－20℃备用。使用前，储存的细胞须在新鲜制备的甲醇-乙酸酸性固定液中重悬。

（11）轻度离心沉淀细胞（400 *g*），弃上清液，留下足够的固定液重悬细胞，终浓度为 1×10^6～5×10^6 个细胞/ mL。

（12）准备载玻片，用 100％的甲醇轻轻冲洗。

（13）在本生焰上加热巴斯德细管制备细毛细管。

（14）将 1 mL 45％的乙酸处理玻片表面然后将乙酸溶液滴下。

（15）用一根细的毛细管［来自**步骤（13）**］，尽快将固定的细胞点在整张载玻片上。

（16）让过量的固定液流掉并风干玻片过夜。

（17）室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗并再水化玻片 15 min，同时轻轻晃动。

（18）室温下在玻片染色缸中用甲醛［4％（*V/V*）溶于 PBS］固定玻片 2 min，同时轻轻晃动。

（19）室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。

（20）37℃水浴下在玻片染色缸中用预热的（37℃）酸化的胰蛋白酶溶液消化处理玻片 10 min，同时轻轻晃动。

(21) 室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 2 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。

(22) 室温下在玻片染色缸中用甲醛［4%（V/V）溶于 PBS］固定玻片 2 min，同时轻轻晃动。

(23) 室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。

(24) 室温下在玻片染色缸中依次用 70%、90%和 10%的乙醇处理玻片 5 min 使样品再脱水，同时轻轻晃动。

(25) 室温风干玻片至少 20 min。

(26) 将两滴 12.5 μL 的杂交溶液加在盖玻片上，其中含有 Cy3-PNA 端粒探针（**注释 3**），避免出现气泡，将风干的玻片倒置于盖玻片上。

(27) 在加热板上 80℃加热 3 min 使样品变性。

(28) 将玻片放于塑料玻片盒中，再将盒子放入封口膜密封的湿盒内，室温避光孵育 2 h。

(29) 暗处室温下在科普林缸中用漂洗液 1 冲洗玻片 2 遍，每遍 15 min，并不断摇晃。不要移去盖玻片，在第一步冲洗 10 min 后，它们会从玻片表面掉落。

(30) 避光室温下在玻片染色缸中用漂洗液 2 冲洗玻片 3 遍，5 min，并不断摇晃。

(31) 室温下在玻片染色缸中依次用 70%、90%和 100%的乙醇处理玻片 5 min 使样品脱水，并不断晃动。

(32) 室温风干玻片至少 20 min，避光。

(33) 准备 DAPI 溶液（**注释 4**），将两滴 12.5 μL 的杂交溶液加在盖玻片上，避免出现气泡，将风干的玻片倒置于盖玻片上。静置数分钟直到 DAPI 溶液在样品上展开。

(34) 用指甲油密封玻片，风干数分钟

(35) 密封后的玻片可以避光 4℃保存 3 天，用数字荧光显微镜检测。

2) 图像获取与数据分析

对于 Q-FISH 检测来说，端粒和染色体的图像可以通过任何标准 FISH 图像获取系统获得，只要该系统满足之前详述的标准（***40***）。我们实验室使用 Leica DM RA2 荧光显微镜，带有 PL Apo 100x/1.40-0.7 油镜光圈 0.09∞/0.17 的物镜，以及激发光和散射光滤光器，包括用于 Cy3（Leica 滤光模块 Y3：激发光滤光器 BP545/30 nm，二色镜 565 nm，抑制滤光器 BP：610/75 nm）和用于 DAPI（Leica 滤光模块 A：激发光滤光器 BP340-380 nm，二色镜 400 nm，抑制滤光器 LP：425 nm），以及 HBO 100W/2 汞灯。图像获取的操作需用电荷耦合器件（CCD）照相机（COHU Inc.，San Diego，CA），分辨率设为 700 像素×500 像素和 8 bit 纵深。图像用 Leica Q-FISH 软件处理并用 TFL-TELO 软件分析（***40***），软件由 Drs. Lansdorp 和 Poon 赠予。

为了确定获取端粒信号的最佳曝光范围，使用来自 L5178Y-S 和 L5278-R 鼠白血病细胞系，其中期呈现稳定且已知长度的端粒，分别为 10 kb 和 79 kb（***47***）。**图 5.2A** 为使用 L5178Y-S 和 L5278-R 进行校准的示例。用 Q-FISH 处理这些中期细胞，在不同的曝光时间（通常在 0.05～1.0 s 内）拍摄，直到获得在 L5278-R 细胞的强端粒信号未达饱和时就可以检测到 L5178Y-S 细胞的短端粒的条件为止，也就是说，端粒长度和荧光

强度呈线性关系（**注释 13 和 14**）。另外，为了补偿随时间推移信号强度和光场均匀性的改变，建议周期性捕获 0.2 μm 羧酸修饰的乳胶荧光团的图像（**注释 15**）。用 Cy3-特异性滤光模块（Y3）获取图像，并使用了 TFL-TELO 软件中的“spotIOD”应用分析图像（**注释 16**）。

为了校准端粒长度测量系统，需获取来自 L5178Y-S 和 L5278-R 细胞系的中期相（**注释 17 和 18**）。这些细胞（如前述）的平均端粒长度稳定且已知，因此可以通过线性衰减实现从任意荧光单位到 DNA 长度单位的转换（**图 5.2B**）。任意荧光单位（auf）与 L5178Y-S 和 L5278-R 细胞的端粒长度的线性衰减的斜率用于计算样品的端粒长度［样品的端粒长度（kb）＝样品的 auf/L5178Y-S/R 衰减曲线的斜率］。

对于 Q-FISH 分析，每个样品至少获得 2 个玻片，20～50 个中期相，并使用 TFL-TELO 软件的“染色体/端粒”应用进行分析（**注释 19**）。所获取的输出文件包含按染色体对和染色体分类的端粒长度值，用 Excel 软件整合并分析以获取端粒长度的分布情况（**图 5.2B** 的柱状图）（**注释 20**）。

注意：为了能够比较不同样品的端粒长度，这些样品必须同时捕获。为了比较不同时段获得的值，必须做出不同时段的微珠和 L5178Y-S/L5178-R 细胞的平均 auf 值的线性衰减。这就意味着在图像获取的每一个时段，必须包含如下对照组样品和操作（**注释 16**）：①捕获荧光团的图像以确定显微镜视野的照明。②捕获荧光团和 L5178Y-S/L5178-R 细胞的图像以获得每一时段最终信号强度变化的参考值。③用 L5178Y-S/L5178-R 细胞的信号强度将荧光强度转化为端粒长度值（kb）。

2. Q-FISH 分析分离的间期细胞

当细胞在培养中不能分裂或由于其他原因不能培养时，Q-FISH 分析可以在间期细胞核上进行（***26***，***48***），如下所述。

1）样品制备

新鲜分离的细胞（1×10^6～5×10^6 个细胞）在细胞培养基中悬浮，沉淀，用培养基洗 1 遍，然后用培养基重悬，终体积为 1 mL。接下来，细胞用低渗溶液处理，也就是 5.3.2 节 1. 小节中期相制备的标准实验方案**步骤**（**6**），接下来按这一方案随后的步骤执行。

这项技术同样可用于生长在室形玻片中的间期细胞。这种情况下，实验方案基本上与 Q-FISH 对中期相细胞的方案相同，不同之处在于细胞保持附着于玻片，并且不需要秋水仙胺和低渗处理：

（1）除去室形玻片上的细胞培养基，然后室温下用 PBS 冲洗 3 遍，每遍 5 min。

（2）除去 PBS，留下足够盖满室形玻片表面的体积即可。

（3）缓慢加入新制备的甲醇-乙酸酸性固定液固定细胞，同时持续地轻轻混匀。

（4）室温下孵育 5 min 并重复**步骤**（**3**）2 遍。

（5）除去固定液并风干室形玻片过夜。

（6）除去室形破片外壁并按照 5.3.2 节 1. 小节中描述的中期相制备标准方案操作，

从**步骤（18）**开始。

2）图像获取和数据分析

Q-FISH 分析间期细胞核操作复杂的原因在于，间期时端粒分布于整个细胞核中的不同平面上。因此，调节显微镜的焦距使准确对焦对大多数端粒的观察是十分重要的。用这种方案，大约可拍摄到 100 个核，然后使用 TFL-TELO 的“spot IOD”应用程序分析获得端粒图像。在用 Excel 整合数据之前，建议先将信号柱状图中的尖刺和双峰移去（**注释 21**）。

3. Q-FISH 分析石蜡和冷冻切片

1）样品制备

对石蜡切片，按如前所述的标准的 Q-FISH 实验方案（***47***），并包括用二甲苯脱去石蜡和后续的再水化过程：

（1）室温下在玻片染色缸中用二甲苯冲洗玻片 3 遍，每遍 3 min，同时轻轻晃动。

（2）在玻片染色缸中依次用 100%、90%和 70%的乙醇处理玻片 5 min，使样品再水化，并轻轻晃动。

（3）室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 3 遍，每遍 5 min，并轻轻晃动。

（4）按照 5.3.2 节 1. 小节中描述的中期相制备标准方案操作，从**步骤（18）**开始。

标准的 Q-FISH 实验方案适用于冷冻切片时无需其他额外的步骤。切片只需室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。按照 5.3.2 节 1. 小节中描述的中期相制备标准方案操作，从**步骤（18）**开始。

2）图像获取和数据分析

Q-FISH 分析组织切片上的细胞核基本按照前述的间期细胞核分析的方法操作（**注释 22**）。

4. 结合免疫组化染色和 Q-FISH

Q-FISH 检测可以与免疫组化染色技术相结合应用于组织切片和培养的细胞上。一般来说，Q-FISH 检测之前，要根据抗体说明书对样品进行固定和免疫组化染色的操作。在免疫组化染色之后，样品（如玻片上的组织切片或生长在室形玻片中的细胞）要室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。按照 5.3.2 节 1. 小节中描述的中期相制备标准方案操作，从**步骤（18）**开始，但要省略胃蛋白酶处理[**步骤（20）**]。

如下示例为小鼠睾丸组织切片的免疫组化染色与 Q-FISH 分析，冷冻切片上同时检测 γ-H2A. X 免疫荧光和端粒长度。

（1）制备睾丸的冷冻切片并在室温下风干过夜。

（2）室温下在玻片染色缸中用冰醋酸固定切片 2 min，同时轻轻晃动。

（3）室温下在玻片染色缸中用含 0.1%（V/V）Triton X-100 的 PBS 透化处理切片两遍，每遍 15 min，同时轻轻晃动。

（4）室温下在湿盒中用 5%（m/V）的 BSA 在 PBS 中封闭样品 30 min。

（5）用一抗［抗磷组蛋白 H2AX（Ser139）小鼠单克隆 IgG1（Uptake，Lake Placid，NJ)在 2%（m/V）BSA 的 PBS 溶液中 1∶500 稀释］，室温下在湿盒中孵育 1 h。

（6）室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。

（7）用二抗［Alexa Fluro488-标记的羊抗鼠 IgG（H+L）（Molecular Probes，invitrogen，Carlsbad，CA)］在 2%（m/V）BSA 的 PBS 溶液中 1∶400 稀释，室温下在湿盒中孵育 1 h。

（8）室温下在玻片染色缸中用 PBS 冲洗玻片 3 遍，每遍 5 min，同时轻轻晃动。

（9）按照 5.3.2 节 1. 小节中描述的中期相制备标准方案操作，从**步骤（18）**开始，但要省略胃蛋白酶处理［**步骤（20）**］。

5. Q-FISH 与细胞遗传学研究相结合

由于端粒长度在染色体对和染色体臂上存在差异，端粒的功能障碍可能只涉及部分染色体。因此，测量特定染色体的端粒长度很有价值。在这种特定的情况下，可以记录玻片上中期相的位置（*x-y* 坐标），在 Q-FISH 之后，样品可以用于染色体绘制（***43***）或光谱核型分析（SKY）（***58***）。接着可以回到先前所捕获的每一个中期相并确定单独的染色体末端的端粒长度。

染色体绘制试剂盒（STAR * FISH 染色体绘制试剂盒；Cambio，Cambridge，UK 和 SkyPaint 试剂盒与 SkyVision 系统；Applied Spectral Imaging，Carlsbad，CA）都可用于 Q-FISH 之后的分析。分析之前，用丙酮溶解封片剂以移去盖玻片，并且用 PBS 冲洗玻片。之后，样品可以按照制造商提供的染色体绘制或 SKY 试剂盒的操作方案来处理。需要注意的是，在 Q-FISH 分析之后使用 SKY 操作时，要从 SKY 实验方案中略去胃蛋白酶处理的步骤。

5.3.3 Flow-FISH 分析

1. 样品制备（注释 23）

（1）将 10^6 个细胞在 15 mL Falcon 管中 400 *g* 离心 5 min，使之沉淀。

（2）在加入了 0.1%（m/V）BSA 的 PBS 中冲洗细胞。

（3）400 *g* 离心 5 min 沉淀细胞。

（4）在 2 mL 加入了 0.1%（m/V）BSA 的 PBS 中重悬沉淀，并将样品转移至 2 个 1.5 mL 的 Eppendorf 管中（每管 1 mL）。

（5）12 000 *g* 下离心 15 s。

（6）在 500 μL 杂交缓冲液中重悬沉淀，其中一管作为阴性对照，加入不含 FITC 标记的端粒 PNA 探针的杂交缓冲液。

（7）80℃摇晃 10 min 使样品变性。

（8）室温避光孵育 2 h。

（9）16℃下 650 *g* 离心 8 min。

（10）用 1 mL 漂洗液 1 冲洗样品 2 遍。

（11）16℃下 650 *g* 离心 8 min。

（12）用 1 mL 漂洗液 2 冲洗样品 1 遍。

（13）16℃下 300 *g* 离心 7 min。

（14）在 500 μL 碘化丙啶溶液中重悬沉淀，室温下孵育 2 h（**注释 24**）。

（15）立即用 FACS 检测样品，或 4℃下保存样品最多 2 天。

2. 流式细胞术

Flow-FISH 分析可以在任何传统的流式细胞仪上实现。我们曾使用结合 CellQuest 软件的 FACSCalibur 系统（BD Biosciences，Franklin Lakes，NJ）和结合软件系统 2 的 Coulter Flow Epics（Beckman Coulter Fullerton，CA ），步骤如下。

（1）记录细胞周期，分选足够大小（前向散射光）及复杂性（侧向散射光）的细胞，分析中排除死细胞和碎片。根据碘化丙啶通道（FL2）所呈现的面积和宽度筛选单细胞。

（2）准确地设置门控，只有处于 G_0/G_1 期的细胞（内含 2N DNA）会在碘化丙啶通道的直方图中筛选出来（**图 3A**）。

（3）在 FL1 的直方图中的 G_0/G_1 期细胞，即 FITC 通道，将生成整个细胞端粒荧光强度值的分布，以及描述性的统计学参数（**图 3A**）。为了补偿细胞的自发荧光，需要减掉阴性对照细胞，即没有 FITC-端粒 PNA 探针杂交的细胞的荧光值。

（4）如 Q-FISH 检测，将 L5178Y-R/L5178Y-S 细胞系和其他样品平行处理。这些细胞作为内参以补偿系统内的变化，并且将任意荧光单位转换为端粒长度值（**图 3B**）。

5.4　注释

（1）对于人体样品，可用限制性酶 *Hin*f Ⅰ和 *Rsa* Ⅰ混合物代替 *Mbo* Ⅰ来获取 TRF。

（2）KCl 可代替枸橼酸钠用于低渗处理，特别是在使用人体淋巴细胞和骨髓细胞时。制备 70 mmol/L 的 KCl 水溶液，预热至 37℃。

（3）可以使用 FITC 标记的（CCCTAA）$_3$ PNA 端粒探针作为 Cy3 标记 PNA 探针的另一种选择。但是，需要注意的是用于 DNA 复染色的 FITC 和 DAPI 的发射光谱在一定程度上会交叠（交叉发射）。因此，在使用 FITC 标记的（CCCTAA）$_3$时，强烈建议使用有带通滤光的滤光模块（激发光滤光器：BP 480/40 nm，二色镜：505 nm，抑制滤光器：BP 527/30 nm）。

（4）DAPI 不能与蓝色荧光团一起使用，作为替代，可以使用碘化丙啶将染色体染色。在水中溶解 100 μg/mL 碘化丙啶（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）制备碘化丙啶储备液，分装保存于－20℃。工作液现用现配，使用抗荧光猝灭溶液（Vectashield Vector Laboratories，Burlingames，CA）稀释储备液至终浓度为 0.1 μg/mL（***37***）。注

意碘化丙啶不能与红色荧光团一起使用，如 Cy3 标记的端粒探针。因此，在端粒的检测中，碘化丙啶对染色体的染色经常结合 FITC-标记的（CCCTAA)$_3$ PNA 探针对端粒的染色。注意碘化丙啶和 FITC 的交叉发射光谱是这种方法的一个主要的缺陷。

（5）此处推荐的 Vectashield 封片液混合物的替代品在 Heslop-Harrison 集团主页上有详细介绍（http://www.le.ac.uk/biology/phh4/proflustaindna.htm）。

（6）此处推荐的 Slow-Fade Antifade Kit 可以用更为经济的自制方法代替，David Spector 实验室的主页上有详细介绍（http://spectorlab.cshl.edu/flourescence_medium.html）。

（7）对于含有长端粒生物体样品所做的 TRF 分析，如实验室近交小鼠，用蛋白酶和限制性酶消化时将细胞包埋于琼脂糖胶块中是十分重要的，这样做是为避免基因组 DNA 断裂，就像在传统的 DNA 提取操作中所发生的那样。值得注意的是，这步操作对于人体样品 TRF 的质量同样有提升作用。

（8）为了简化对端粒大小的定量，也许有人会希望将放射性标记的标准分子质量作为参照。详细的制备^{32}P-标记的高分子质量标准 DNA 的实验方案可参阅 Stewart 实验室主页（http://www.stewartlab.wustl.edu/html/lab_protocols.html）。另外，将带有标准分子质量 DNA 的溴化乙锭染色的凝胶图片与标尺共同列出，可以用于确定端粒长度。

（9）除了此处描述的基于经典 Southern 印迹法的 TRF 分析，还可以使用一种较为灵敏的凝胶内杂交方法（***36***）。这种方法中，凝胶在溴化乙锭染色之后，要在滤纸上 50℃吸干 1 h。随后，凝胶在 20 mmol/L NaH_2PO_4，0.1% SDS，5×Denhardt's 试剂和 5×SSC 中，55℃预杂交 1 h。凝胶置于 5 mL 预杂交的溶液中与 T4-多核苷酸激酶^{32}P-标记的（TTAGGG)$_4$ 或（CCCTAA)$_4$ 寡核苷酸探针 55℃杂交 3 h 或过夜。凝胶在室温下用 3×SSC 中洗涤 3 遍，每遍约 20 min，然后在 58℃下用 3×SSC/0.1% SDS 洗 3 遍，每遍 20 min。凝胶的放射自显影使用 Kodak X-OMAT 底片或暴露于磷光屏下 30 min或过夜。

（10）秋水仙胺处理持续的时间取决于各种类型细胞的周期速率（如淋巴细胞和骨髓细胞为 2 h，而原代成纤维细胞为 4 h）。在增殖活跃的细胞中，如骨髓细胞，在低渗处理时加入秋水仙胺就足够了［**步骤（5）～（7）**］，而没有必要在细胞培养中加入。另外，可以使用终浓度为 50 μg/mL 的诺考达唑使细胞停滞于中期。

（11）当细胞培养物中混合了贴壁和不贴壁细胞时，如骨髓细胞培养，或者如果希望同时对贴壁细胞培养中的漂浮细胞进行端粒长度分析，要从原本的细胞培养物中吸取培养液，并将其保存在收集贴壁细胞群所用的失活的胰蛋白酶中。

（12）使用 KCl 低渗处理时（**注释 2**），在 37℃下的孵育的时间必须减少到 15～20 min，也可选择室温孵育 25～30 min。

（13）饱和水平根据获取图片的纵深字节数而改变（如 8 字节为 255 而 12 字节图像为 4095）。我们的系统图像在 8 字节纵深获取。

（14）为了获得荧光强度和曝光时间之间的线性相关性，最好关闭后处理选项，如 gamma 校正。

(15) 荧光团玻片的制备是将 2 μL 羧基修饰的橘色荧光团（直径 0.2 μm，在胎牛血清中 1∶25～1∶50 稀释）涂于整个玻片表面并将其风干。接下来，向盖玻片上加 10 μL Slow-Fade Antifade Kit 的组分 A，将干燥的载玻片倒扣于盖玻片上，避免出现气泡。静置数分钟，直到悬液完全展开。

(16) 在玻片的中心区域和边角的若干个点上记录荧光团强度值。在一个均匀的明场中，强度值的变化不应超过 5%。荧光信号强度的平均值用于校正端粒信号强度值，它可能随时间而变化。

(17) 另一种选择是使用携带确定长度的克隆端粒片段的质粒（***46***）。但是，含有极少量并且没有组蛋白的端粒重复片段的质粒，向长达 150 kb 的端粒染色质的外扩可能存在问题，因此最好用由 TRF 鉴定得到的确定的细胞中端粒长度对这种方法进行校准。

(18) 除了用带有已知端粒长度的细胞系或质粒外部校准 Q-FISH 系统，另一种校准方法使用着丝粒探针作为内参（***59***）。这种方法可以计算着丝粒/端粒的比值，以补偿该处的背景荧光。

(19) 请注意 TFL-TELO 软件只接受位图格式（BMP）的图像。

(20) 端粒长度通常不服从正态分布，而是一个偏态分布（**图 5.2B**）。对于偏态分布，其中位数或模式用于计算“平均”端粒长度。尽管如此，在这一领域用平均值±标准偏差或标准误差来定量地描述端粒长度分布是很普遍的。注意这种类型实验中的标准偏差反映的不是实验的精准度，而是端粒长度分布的宽度和不对称性这个固有的特征属性。在文献中常报道的是标准误差，它由于分析的端粒数量很大而非常小（***60***，***61***）。为了计算两个端粒分布是否有显著区别，可以用 Wilcoxon Rank Sum 检测。

(21) 为了获得更好的结果，可以使用共聚焦显微镜更精确地分析 Q-FISH 间期相细胞核。用 Leica TCS-SP2-AOBS-UV 共聚焦显微镜和光学切片，可以成功捕获所有间期细胞核的端粒。最大发射强度可以用 LCS lite Leica 软件定量。

(22) DAPI 图像有助于鉴定形态学结构。在某些情况下，为了识别所分析的细胞类型，可能有必要用相关的组织学染料对切片染色，如苏木精-伊红染色，或应用 5.3.2 节 4. 小节中描述的免疫染色 Q-FISH 技术。

(23) 来自细胞培养或组织消化的悬浮的分离细胞都可以用于 FLOW-FISH 检测。

(24) 碘化丙啶显示出很宽的散射光谱（550～750 nm），对端粒 FITC 信号造成相当大的干扰。为防止这一问题发生，需要将碘化丙啶维持在低浓度（0.1 μg/mL）以及对 FL2（碘化丙啶）和 FL1（FITC）的荧光信号进行补偿。除了使用碘化丙啶，许多市售化合物可以用于 DNA 的复染色：0.05～0.1 μg/mL LDS 751（Exciton Chemical，Dayton，OH），10 μg/mL 7-AAD（Molecular Probes，OR），10 μmol/L Hoechst H 33342（Molecular Probes，OR），0.1～1 μmol/L DRAQ-S（Biostatus Limiter，UK）。对于当中的每一个化合物，染色要在最后冲洗步骤之后进行［**步骤（13）**］，室温下在 PBS 或 FACSFlow（BD Biosciences，Franklin Lakes，NJ）中孵育细胞至少 20 min，含有 0.1%（*m/V*）BSA，10 μg/mL RNase A，以及上述浓度的 DNA 复染液。特别地，7-AAD 和 LDS 751 表现出对 FITC 更少的干扰。关于更详细的 Flow-FITC 确定端粒长度的技巧，请见**参考文献 62**。

参 考 文 献

1. Blackburn, E. H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**, 661-673.
2. de Lange, T. (2004) T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **5**, 323-329.
3. Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002) Different telomere damage signalingpathways in human and mouse cells. *EMBO J*. **21**, 4338-4348.
4. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., et al. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-198.
5. Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.* **13**, 1549-1556.
6. Olovnikov, A. M. (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significanceof the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181-190.
7. Shay, J. W. and Wright, W. E. (2005) Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**, 867-874.
8. Collins, K. and Mitchell, J. R. (2002) Telomerase in the human organism. *Oncogene* **21**, 564-579.
9. Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., et al. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10, 114-10, 118.
10. Kitada, T., Seki, S., Kawakita, N., Kuroki, T., and Monna, T. (1995) Telomere shortening in chronic liver diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 33-39.
11. Okuda, K., Khan, M. Y., Skurnick, J., Kimura, M., Aviv, H., and Aviv, A. (2000) Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **152**, 391-398.
12. Jeanclos, E., Krolewski, A., Skurnick, J., et al. (1998) Shortened telomere length in white blood cells of patients with IDDM. *Diabetes* **47**, 482-486.
13. Decary, S., Mouly, V., Hamida, C. B., Sautet, A., Barbet, J. P., and Butler-Browne, G. S. (1997) Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther*. **8**, 1429-1438.
14. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* **18**, 173-179.
15. von Zglinicki, T., Serra, V., Lorenz, M., et al. (2000) Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab. Invest.* **80**, 1739-1747.
16. Samani, N. J., Boultby, R., Butler, R., Thompson, J. R., and Goodall, A. H. (2001) Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* **358**, 472-473.
17. Wu, X., Amos, C. I., Zhu, Y., et al. (2003) Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *J. Natl. Cancer Inst*. **95**, 1211-1218.
18. Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., et al. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**, 25-34.
19. Lee, H. W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., 2nd, Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**, 569-574.
20. Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W. and Blasco, M. A. (1999) Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J*. **18**, 2950-2960.
21. Herrera, E., Martinez, A. C., and Blasco, M. A. (2000) Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres. *EMBO J*. **19**, 472-481.
22. Herrera, E., Samper, E., and Blasco, M. A. (1999) Telomere shortening in mTR-/-embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO J*. **18**, 1172-1181.

23. Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., et al. (1999) Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell* **96**, 701-712.

24. Franco, S., Segura, I., Riese, H. H., and Blasco, M. A. (2002) Decreased B16F10 melanoma growth and impaired vascularization in telomerase-deficient mice with critically short telomeres. *Cancer Res.* **62**, 552-559.

25. Samper, E., Fernandez, P., Eguia, R., et al. (2002) Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells. *Blood* **99**, 2767-2775.

26. Leri, A., Franco, S., Zacheo, A., et al. (2003) Ablation of telomerase and telomere loss leads to cardiac dilatation and heart failure associated with p53 upregulation. *EMBO J.* **22**, 131-139.

27. Harley, C. B. (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* **256**, 271-282.

28. Harley, C. B. (1995) Telomeres and aging, in *Telomeres* (Blackburn, E. H. And Greider, C. W., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: pp. 247-264.

29. Nakamura, Y., Hirose, M., Matsuo, H., Tsuyama, N., Kamisango, K., and Ide, T. (1999) Simple, rapid, quantitative, and sensitive detection of telomere repeats in cell lysate by a hybridization protection assay. *Clin. Chem.* **45**, 1718-1724.

30. Freulet-Marriere, M. A., Potocki-Veronese, G., Deverre, J. R., and Sabatier, L. (2004) Rapid method for mean telomere length measurement directly from cell lysates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314**, 950-956.

31. Therkelsen, A. J., Nielsen, A., Koch, J., Hindkjaer, J., and Kolvraa, S. (1995) Staining of human telomeres with primed in situ labeling (PRINS). *Cytogenet. Cell Genet.* **68**, 115-118.

32. Baird, D. M., Rowson, J., Wynford-Thomas, D., and Kipling, D. (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat. Genet.* **33**, 203-207.

33. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., et al. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG) n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6622-6626.

34. Allshire, R. C., Gosden, J. R., Cross, S. H., et al. (1988) Telomeric repeat from T. thermophila cross hybridizes with human telomeres. *Nature* **332**, 656-659.

35. Kipling, D. and Cooke, H. J. (1990) Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* **347**, 400-402.

36. Hemann, M. T. and Greider, C. W. (1999) G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3964-3969.

37. Lansdorp, P. M., Verwoerd, N. P., van de Rijke, F. M., et al. (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 685-691.

38. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**, 1497-1500.

39. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., et al. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature* **365**, 566-568.

40. Poon, S. S., Martens, U. M., Ward, R. K., and Lansdorp, P. M. (1999) Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* **36**, 267-278.

41. Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., et al. (1997) Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7423-7428.

42. Martens, U. M., Zijlmans, J. M., Poon, S. S., et al. (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* **18**, 76-80.

43. Samper, E., Flores, J. M., and Blasco, M. A. (2001) Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in Terc-/-mice with short telomeres. *EMBO Rep.* **2**, 800-807.

44. Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y., and Greider, C. W. (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* **107**, 67-77.

45. Zou, Y., Sfeir, A., Gryaznov, S. M., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2004) Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol. Biol. Cell* **15**, 3709-3718.

46. Hanish, J. P. , Yanowitz, J. L. , and de Lange, T. (1994) Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8861-8865.
47. McIlrath, J. , Bouffler, S. D. , Samper, E. , et al. (2001) Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells. *Cancer Res.* **61**, 912-915.
48. Gonzalez-Suarez, E. , Samper, E. , Flores, J. M. , and Blasco, M. A. (2000) Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat. Genet.* **26**, 114-117.
49. Nagele, R. G. , Velasco, A. Q. , Anderson, W. J. , et al. (2001) Telomere associations in interphase nuclei: possible role in maintenance of interphase chromosome topology. *J. Cell Sci.* **114**, 377-388.
50. Munoz, P. , Blanco, R. , Flores, J. M. , and Blasco, M. A. (2005) XPF nucleasedependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat. Genet.* **37**, 1063-1071.
51. Rufer, N. , Dragowska, W. , Thornbury, G. , Roosnek, E. , and Lansdorp, P. M. (1998) Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* **16**, 743-747.
52. Hultdin, M. , Gronlund, E. , Norrback, K. , Eriksson-Lindstrom, E. , Just, T. , and Roos, G. (1998) Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3651-3656.
53. Batliwalla, F. M. , Damle, R. N. , Metz, C. , Chiorazzi, N. , and Gregersen, P. K. (2001) Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsilar B cells. *J. Immunol. Methods* **247**, 103-109.
54. Baerlocher, G. M. and Lansdorp, P. M. (2003) Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* **55**, 1-6.
55. Azzalin, C. M. , Mucciolo, E. , Bertoni, L. , and Giulotto, E. (1997) Fluorescence in situ hybridization with a synthetic (T2AG3) n polynucleotide detects several intrachromosomal telomere-like repeats on human chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **78**, 112-115.
56. Ouellette, M. M. , Liao, M. , Herbert, B. S. , et al. (2000) Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *J. Biol. Chem.* **275**, 10, 072-10, 076.
57. Franco, S. , Alsheimer, M. , Herrera, E. , Benavente, R. , and Blasco, M. A. (2002) Mammalian meiotic telomeres: composition and ultrastructure in telomerasedeficient mice. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 335-340.
58. Garcia-Cao, M. , O'Sullivan, R. , Peters, A. H. , Jenuwein, T. , and Blasco, M. A. (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.* **36**, 94-99.
59. O'Sullivan, J. N. , Bronner, M. P. , Brentnall, T. A. , et al. (2002) Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat. Genet.* **32**, 280-284.
60. Hande, M. P. , Samper, E. , Lansdorp, P. , and Blasco, M. A. (1999) Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J. Cell Biol.* **144**, 589-601.
61. Espejel, S. , Franco, S. , Rodriguez-Perales, S. , Bouffler, S. D. , Cigudosa, J. C. , and Blasco, M. A. (2002) Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* **21**, 2207-2219.
62. Baerlocher, G. M. , Mak, J. , Tien, T. , and Lansdorp, P. M. (2002) Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* **47**, 89-99.

第6章　体外老化体系中检测DNA甲基转移酶1基因转录的方法

A Method to Detect DNA Methyltransferase I Gene Transcription *In Vitro* in Aging Systems

Joel B. Berletch，Lucy G. Andrews，Trygve O. Tollefsbol

摘要　DNA表观遗传学变化在决定基因结构和表达上扮演重要角色。胞嘧啶5位上的甲基化被认为是哺乳动物基因组中最普遍的修饰。研究普遍表明，基因调控区域的过度甲基化与基因失活和转录水平降低相关联，而且发育中确定甲基化模式的改变会影响到胚胎的生存能力。甲基化的改变也与衰老和肿瘤发生相关。DNA甲基转移酶1（DNMT1）被认为在DNA复制中维持已形成的甲基化模式中起重要作用，催化甲基从*S*-腺苷-L-甲硫氨酸（SAM）转移到CpG二核苷酸中胞嘧啶5位。一些研究表明衰老过程中DNMT1的活性和转录会发生变化，这里我们介绍一种检测培养的衰老细胞DNMT1 mRNA转录的综合方法。

关键词　DNA甲基化；衰老；CpG二核苷酸；肿瘤发生；SAM

6.1　引言

胞嘧啶5位的DNA甲基化被认为是哺乳动物基因组中最为普遍的修饰，而调控区域基因的甲基化与基因表达负相关（1）。胞嘧啶的甲基化模式与很多细胞过程相关联，包括染色质结构（*2*）、发育（*3*）、致癌作用（*4*）和老化（*5*，*6*）。DNA甲基转移酶（Dnmt）催化甲基从*S*-腺苷-L-甲硫氨酸（SAM）转移到CpG二核苷酸中胞嘧啶5位（*7*，*8*）。在脊椎动物的体细胞组织中已经鉴别出一些Dnmt，Dnmt1是哺乳动物细胞中含量最丰富的甲基转移酶，主要与维持新合成的DNA中已形成的甲基化模式相关（*3*）。

甲基化模式在正常胚胎发育过程中已表现出其重要性。例如，针对Dnmt1的单克隆抗体在非洲蟾蜍胚胎发育早期会使细胞分裂停止。形态学数据表明细胞停滞在分裂间期，生物化学分析显示出细胞尚未进入M期，都支持了这一点（*9*）。$Dnmt1^{-/-}$和$Dnmt3b^{-/-}$在小鼠体内的突变导致胚胎死亡，带有Dnmt1，$3a^{-/-}$突变的小鼠会在大约4周龄时死亡（*10*，*11*）。一项研究表明人体系统中DNMT的活性显示了WI-38成纤维细胞衰老中维持性甲基化作用降低，而随着细胞衰老新生甲基化最初降低但之后会升高（*12*）。很多新近的研究显示了Dnmt在胚胎发育和衰老中所扮演的重要角色，然而，

仍存在很多亟待阐明的问题，而且针对体内和体外 Dnmt 活性的研究对理解诸如衰老这样的重要生物学过程的机制是必要的。

6.2 材料

6.2.1 RNA 提取和定量

（1）～（4）包含在 Qiagen RNeasy Mini Kit 中（cat. no. 74104）。

（1）RNeasy 微型离心柱。

（2）RLT 缓冲液。

（3）RPE 缓冲液。

（4）RWI 缓冲液。

（5）QIAshredder Qiagen（cat. no. 79656）。

（6）β-巯基乙醇。

（7）磷酸盐缓冲液（PBS）。

（8）乙醇（70%和 100%）。

（9）石英分光光度计（Sigma，St. Louis，MO；cat. no. C-5178）。

（10）SmartSpec™ Plus 分光光度计（Bio-Rad，Hercules，CA）。

6.2.2 cDNA 合成和序列特异 PCR

（1）～（4）包含在逆转录（RT-PCR）试剂盒的 SuperScript™ First-Strand Synthesis System 中（Invitrogen，Carlsbad，CA；cat. no. 11904-018）。

（1）对照 RNA。

（2）50 ng/μL 随机的六聚混合物。

（3）10 mmol/L dNTP 混合物。

（4）二乙基焦磷酰胺（DEPC）处理的水。

（5）薄壁的 0.2 mL PCR 管。

（6）基因特异性引物。

（7）PCR Master Mix（Promega，Madison，Wl；cat. no. M750B）。

（8）不含核酸酶的水。

6.2.3 凝胶电泳

（1）凝胶电泳仪（Bio-Rad，Hercules，CA）。

（2）凝胶电泳级琼脂。

（3）1×TAE 缓冲液。

（4）100 bp 标准分子质量 DNA（Promega，Madison，WI；cat. no. O210A）。

（5）6×上样染料（Promega，Madison，WI；cat. no. G190A）。

（6）10 mg/mL 溴化乙锭溶液。

（7）紫外线（UV）透照仪。

6.3　方法

6.3.1　制备细胞提取物

下述实验方案是适合贴壁的衰老细胞培养，悬浮生长细胞见**注释 1**。

（1）吸弃实验组和对照组细胞培养中的培养基。

（2）用预热至 37℃的 1×PBS 冲洗培养瓶底（**注释 2**）。

（3）直接向培养瓶底加入一定量的胰蛋白酶-EDTA 并在 37℃下孵育 5～6 min（**注释 2**）。

（4）用预热至 37℃的培养基冲洗培养瓶底，以收集分离的细胞，将培养瓶中的培养基、胰蛋白酶、细胞混合物转移至 15 mL 锥形管中以备离心（**注释 2**）。

（5）离心沉淀细胞并将沉淀在 PBS 中重悬（**注释 2**）。选择合适方法对细胞进行计数（**注释 3**）。

（6）将 1×10^6～3×10^6 个细胞置于 1.5 mL 管中，离心沉淀细胞。除去管中全部 PBS。细胞沉淀可－80℃冻存备用。

6.3.2　细胞裂解和均质化

（1）将 10 μL β-巯基乙醇加入 1mL RLT 缓冲液中，制备细胞裂解缓冲液。

（2）如 6.3.1 节中所述轻弹管壁以分散细胞沉淀，然后吸取 350 μL 新制的细胞裂解缓冲液加入到 6.3.1 节中获得的细胞沉淀中。很重要的一点是要对沉淀进行大量分散破坏以达到完全裂解。

（3）均质化：吸取细胞裂解物至装有 QIAshredder 的 2 mL 收集管中，并在微量离心机中以最大速度离心 2 min。

6.3.3　RNA 提取

由于 RNA 不稳定，以下实验操作要迅速，每个步骤之间不能有过长停顿。不建议同时从多于 6～7 个样品中提取 RNA。

（1）向已均质化处理的细胞裂解物中加入 350 μL 70％乙醇，吹吸彻底混匀，上下吹吸混合物至少 10 次。将全部样品（700 μL）加到 RNeasy 微型离心柱上，8000 *g* 离心 30 s。

（2）弃去收集管中的液体并加入 700 μL 的缓冲液 RW1 到同一个离心柱，8000 *g* 离心 30 s。

（3）将 RNeasy 柱转移到一个新收集管上，弃去**步骤**（**3**）所用的装有流动相的管。

（4）将 4 体积 100％乙醇加入 1 体积 RPE 浓缩液中制备 RPE 缓冲液。加入 500 μL 制备好的 RPE 缓冲液至 RNeasy 柱，8000 *g* 离心 30 s。

（5）弃去收集管中的液体，再加入 500 μL 制备好的 RPE 至 RNeasy 柱，8000 *g* 离心 2 min。

（6）将 RNeasy 柱置于一个新的收集管上，最大速度离心 1 min（**注释 4**）。

（7）将 RNeasy 柱置于一个 1.5 mL 收集管上，通过加入 30 μL 不含 RNase 的水洗脱离心柱上的 RNA。将柱立置 1 min，然后 8000 *g* 离心 1 min。

6.3.4 RNA 定量

（1）用 70%乙醇洗涤石英比色杯 1 次，接着用无菌水洗 2 或 3 次以确保其清洁。

（2）向比色杯中加入 495 μL 无菌水，对分光光度计进行调零。吸取 5 μL 6.3.3 中提取的 RNA，轻轻上下颠倒混匀。

（3）每个样品都重复**步骤（2）**以定量。

（4）分光光度计浓度的读数是 μg/mL，将读数单位转换为 μg/μL。

6.3.5 第一链 cDNA 合成

（1）对于获得的每个 RNA 样品，制备一个含有**表 6.1** 中列出试剂的混合物（*n* 是为获得理想浓度 cDNA 所需的 RNA 样品量）。

（2）每个样品都在 65℃下孵育 5 min，接着置于冰上短暂孵育。

（3）在**步骤（2）**孵育的同时，制备可供所有样品（包括对照组）使用的足量的反应标准混合物，如**表 6.2** 所述。

（4）吸取 9 μL 反应标准混合物至每个含有**步骤（1）**的混合物的管中，涡旋振荡以混匀，然后短时离心收集样品。

（5）25℃孵育 2 min。

（6）向每管中加入 1 μL SuperScript Ⅱ逆转录酶并轻轻混匀，然后短时离心收集。

（7）25℃孵育 10 min。

（8）将试管转移至 42℃，孵育 50 min。

（9）70℃孵育 15 min，然后再置于冰上以终止反应。

（10）短时离心收集样品，向每管中加入 1 μL RNase H。37℃孵育 20 min。此时，样品已转化为 cDNA，可用于序列特异性 PCR。

表 6.1 RNA 和混合引物

试剂	样品反应	阳性 RT 对照
1～3 μg RNA 样品	*n* μL	—
对照 RNA	—	1 μL
随机六聚物	1.5 μL	1.5 μL
dNTP 混合物	1.5 μL	1.5 μL
水	至 10 μL	至 10 μL

表 6.2　cDNA 反应标准混合物

试剂	每次反应
10×逆转录缓冲液	2 μL
25 mmol/L $MgCl_2$	4 μL
0.1 mol/L 二硫苏糖醇	2 μL
RNaseOUT 核糖核酸酶抑制剂	1 μL

6.3.6　PCR 扩增 *DNMT1* 基因

（1）制备包含**表 6.3** 中所列出试剂的标准混合物。

（2）对于每个反应，向含有 27 μL 制备好的标准混合物的 0.2 mL PCR 管中加入 3 μL 6.3.5 节中所描述的 cDNA 样品。

（3）轻轻混匀，短时离心收集。

（4）如下所述操作 PCR：94℃ 5 min；94℃ 30 s，55℃ 40 s，72℃ 40 s 进行 33 个循环；然后 72℃维持 7 min。

表 6.3　序列特异性 PCR

试剂	每次反应
2×PCR 标准混合物（Promega，Madison，WI；cat. no. M750B）	15 μL
不含核酸酶的水	9 μL
正向：5′-ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA-3′	3 μL 正向和反向
反向：5′-GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGTGG-3′	引物混合物

6.3.7　凝胶电泳

（1）混合 2 g 琼脂糖和 100 mL TAE 缓冲液制备 2%琼脂糖凝胶。

（2）每孔加入 2 μL 6×上样染料和 10 μL 6.3.6 节中所描述的样品。

（3）电泳可以选择在 100 V 进行大约 30 min，或在 50 V 进行 1 h。

（4）混合 20 μL 溴化乙锭和大约 100 mL TAE 缓冲液，孵育凝胶 15 min。确保在孵育凝胶前彻底混匀溴化乙锭和 TAE 溶液。

（5）在 UV 透照仪下观察结果，如**图 6.1** 所示。

6.4　注释

（1）游离或悬浮的细胞的提取计数略有不同。收集细胞并置于 15 mL 的锥形管中，离心沉淀，而无需使用胰蛋白酶解离细胞。接下来按照 6.3.1 节中的**步骤（5）**操作。

（2）加入胰蛋白酶的量由实验中所用培养皿的大小来决定。例如，解离 75 mm^2 的平皿上的细胞，需加入 3.5 mL 的胰蛋白酶，接着在 37℃下孵育 5～6 min。每周一次的胰蛋白酶消化并不会影响培养细胞的增殖能力（***13***）。但是由于胰蛋白酶有刺激性，细

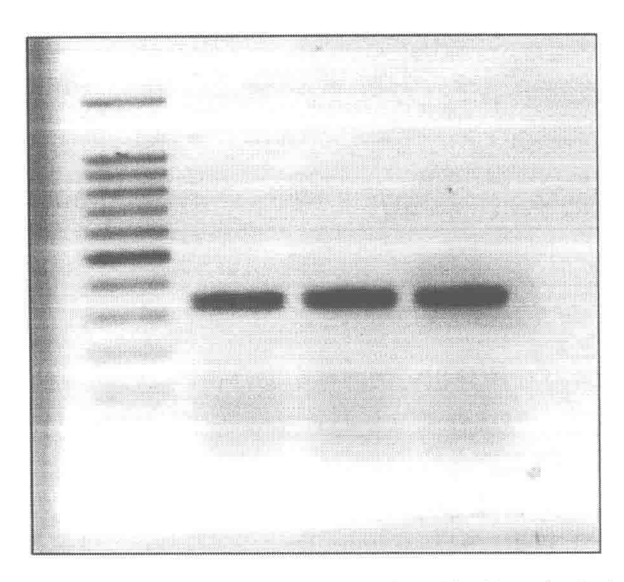


图 6.1　扩增 *DNMT1* 的 cDNA。细胞被裂解，提取总 mRNA，接着转化为 cDNA，分别如 6.3.2 节、6.3.3 节和 6.3.5 节中详述。cDNA 的扩增通过 PCR 实现，溴化乙锭染色，在 2%的琼脂糖凝胶上显影

胞不能暴露其中超过所需的时间。培养基中的血清成分使胰蛋白酶失活，分离的细胞必须用 5～6 mL 的培养基重悬。PBS 的用量也要根据培养皿的大小而定，用足以覆盖培养皿底面的量来有效地洗去培养基。

(3) 细胞计数可以通过多种不同的方法实现。用血球计数板计数是一种简便的确定细胞大致数量的方法。细胞如上文所述在 PBS 中悬浮，涡旋振荡大约 1 min 以分散沉淀。将 25 μL 的细胞悬液加入 1.5 mL 收集管中并与 75 μL 台盼蓝染料混匀。将 9 μL 的细胞/台盼蓝混合物加到血球计数板上。死细胞被染成深蓝色，不计入在内。流式细胞术也是一种细胞计数的方法。测定体积的流式细胞术用于计数给定体积内细胞的绝对数量，比血球计数板更为精确。

(4) 6.3.1 中的**步骤 (6)** 是选做的，用于清除洗脱 RNA 样品时残留的乙醇。强烈建议执行这一附加的步骤，因为乙醇的污染会降低 RNA 的产率和 cDNA 的转化。

参考文献

1. Yeivin, A. and Razin A. (1993) Gene Methylation patterns and expressions. *EXS*. **64**, 523-568.
2. Adams, R. L. (1990) DNA methylation. The effect of minor bases on DNA-protein interactions. *Biochem J*. **265**, 309-320.
3. Lei, H., Oh, Sp., Okano, M., et al. (1996) De novo DNA cytosine methyltranserase activities in mouse embryonic stem cells. *Develompment* **122**, 3195-3205.
4. Warnecke, P. M. and Bestor, T. H. (2000) Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol*. **12**, 68-73.
5. Cooney, C. A. (1993) Are somatic cells inherently deficient in methylation metabolism? A proposed mechanism for

DNA methylation loss, senescence and aging. *Growth* **57**, 261-273.

6. Tollefsbol, T. O. and Andrews, L. G. (1993) Mechanism for methylation-mediated gene silencing and aging. *Med Hypotheses*. **41**, 83-92.
7. Adams, R. L., McKay, E. L., Craig, L. M., and Burdon, R. H. (1979) Mouse DNA methylase: methylation of native DNA. *Biochem Biophys Acta*. **561**, 345-357.
8. Ramsahoye, B. H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., and Jaenisch, R. (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 5237-5242.
9. Hashimoto, H., Suetake, I., and Tajima, S. (2003) Monoclonal antibody against DNMT1 arrests the cell division of xenopus early-stage embryos. *Exp Cell Res*. 286 (2), 252-262. Erratum in: *Exp Cell Res* **289** (2), 396.
10. Hansen, R. S., Wijmenga, C., Luo, P., et al. (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14, 412-14, 417.
11. Xu, G. L., Bestor, T. H., Bourx, H. D., et al. (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. **503**, 178-191.
12. Lopatina, N., Haskell, J. F., Andrews, L. G., Poole, J. C., Saldanah, S., and Tollefsbol, T. O. (2002) Differential maintenance and De novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J. Cell Biochem*. **84**, 324-334.
13. Hadley, E. C., Kruss, E. D., Cristofalo, V. J. (1979) Trypsinization frequency and loss of proliferative capacity in WI-38 cells. *J. Gerontol*. **34**, 170-176.

第7章　在体外老化系统中研究DNA甲基转移酶表达的方法

A Method to Study the Expression of DNA Methyltransferases in Aging Systems *In Vitro*

Joel B. Berletch，Sharla M. O. Phipps，
Sabrina L. Walthall，Lucy G. Andrews，Trygve O. Tollefsbol*

* Joel Berletch 和 Sharla Phipps 对本工作作出了同等贡献。

摘要　基因调控区域关键蛋白质结合位点的 CpG 二核苷酸的甲基化经常会导致基因沉默。人们提出一种老化机制，解释为何基因调控位点的甲基化积累对于细胞衰老有贡献。DNA 的甲基转移酶（DNMT）催化甲基从 *S*-腺苷-L-甲硫氨酸（SAM）转移到 CpG 二核苷酸的胞嘧啶上，而且负责建立和维持基因组的甲基化模式。除研究 DNMT 的转录之外，对其蛋白质表达的研究也很重要。因为研究表明，在基因的转录保持不变的情况下，这些酶在受到刺激后，可能经历翻译后的变化。这里我们讨论一种在体外老化系统中研究 DNMT 蛋白质表达的方法。

关键词　SAM；DNMT；翻译后；CpG 二核苷酸；老化

7.1　引言

免疫印迹分析是一种对蛋白质表达进行稳定性半定量测量的常用工具。蛋白质会经历包括乙酰化作用、泛素化作用和磷酸化作用等很多翻译后修饰，很多研究应用免疫印迹技术研究蛋白质的这些变化（*1*～*4*）。DNA 甲基转移酶（DNMT）在转移甲基到 CpG 二核苷酸胞嘧啶 5 位的过程中很重要，并以此来调节基因活性。除了 DNMT 的转录改变以外，随着细胞增龄并进入衰老，蛋白质水平也表现出波动（*5*，*6*）。此外，研究也已显示 DNMT 会经历翻译后修饰（*7*），这暗示了在蛋白质水平研究 DNMT 的重要性。以下将介绍我们实验室在老化系统中研究 DNMT 蛋白质表达所使用的技术。简要地说，即分离并定量细胞总蛋白质，接着使蛋白质变性并进行十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），将分离的蛋白质组分转移到膜上并与我们感兴趣的蛋白质的特异性抗体一起孵育，并将探针标记的膜进行显影（详见 7.3.4 节所述）。

7.2 材料

7.2.1 样品制备

（1）磷酸盐缓冲液。

（2）胰蛋白酶-EDTA：0.25%（*m*/*V*）胰蛋白酶/0.2%（*m*/*V*）EDTA，溶于无菌Hank's平衡盐溶液。

（3）蛋白酶抑制剂（**表7.1**）。

（4）NE-PER试剂盒（Pierce，Rockford，IL）。

（5）Bio-Rad Bradford Protein Assay（Bio-Rad，Hercules，CA）。

表7.1 样品制备中建议使用的蛋白酶抑制剂

抑制剂	工作浓度	抑制作用
苄脒	1 mmol/L	胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶（凝血酶、血纤蛋白溶酶）（***9***）
亮抑蛋白酶肽	1～10 μmol/L	丝氨酸蛋白酶、血纤蛋白溶酶、胱氨酸蛋白酶（***10***）
抑蛋白酶肽	10 mg/mL	丝氨酸蛋白酶、血纤蛋白溶酶（***11***）
苯甲基磺酰氟（PMSF）	1～2 mmol/L	带有胰蛋白酶样特异性的丝氨酸蛋白酶（***12***）

7.2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

（1）2×SDS上样缓冲液：250 mmol/L Tris pH 6.8，4% SDS，10%丙三醇，0.006%溴酚蓝，2% β-巯基乙醇。

（2）预染色的标准分子质量蛋白质。

（3）5%预制SDS聚丙烯酰胺凝胶。

（4）1×的电泳缓冲液：3.03 g Tris，14.41 g甘氨酸，1.5 g SDS溶于1 L水中。

7.2.3 转膜和Western印迹

（1）1×转膜缓冲液：3.03 g Tris，14.41 g甘氨酸，100 mL甲醇溶于1 L水中。

（2）按规格剪裁的加厚Whatman滤纸（Bio-Rad，Hercules，CA）。

（3）海绵垫。

（4）Hybond-ECL硝酸纤维素膜。

（5）可热封塑料袋。

（6）脱脂脱水奶粉。

（7）TBST：10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，150 mmol/L NaCl和0.1%的Triton X-100。

（8）一抗（**表7.2**）。

（9）辣根过氧化物酶（HRP）-偶联抗免疫球蛋白IgG二抗。

表 7.2　初级 DNA 甲基转移酶（DNMT）表达分析中使用的一抗

DNA 甲基转移酶	靶蛋白大小/kDa	特异性
DNMT1	170～195	羊多克隆 IgG
DNMT 3a	101～120	羊多克隆 IgG
DNMT 3b	98～110	羊多克隆 IgG

7.2.4　检测

（1）ECL 试剂盒（Amersham，Pharmacia Biotech，Piscataway，NJ）。

（2）Hyperfilm™ ECL（Amersham，Pharmacia Biotech，Piscataway，NJ）。

7.3　方法

7.3.1　样品制备

绝大多数的衰老细胞单层生长而且很容易用胰蛋白酶消化收集以分析 DNMT 蛋白质水平。在收集细胞和提取蛋白质的过程中使用蛋白酶抑制剂（**表 7.1**）是惯例的做法。有许多方法可以提取细胞蛋白质（如 RIPA 和 NP-40），其中 NE-PER 试剂盒（Pierce，Rockford，IL）可以进行细胞核和细胞质提取物的快速分离，这里推荐使用它来提取细胞核 DNMT。

（1）培养用于检测的细胞直到 70%～80%贴壁，用冷的 PBS 洗涤细胞。用胰蛋白酶-EDTA 收集单层细胞并在 300～350 *g*（即 1500 r/mim，使用甩平转子或 45°固定角转子）4℃离心 5 min。

（2）用含有蛋白酶抑制剂的冷的 PBS 洗涤细胞沉淀（**表 7.1**）。

（3）按照 NE-PER 试剂盒的方案裂解细胞。

（4）蛋白质可以在液氮中迅速冷冻以备以后使用。

（5）用 Bradford Assay 鉴定蛋白质（Bio-Rad，Hercules，CA）。

7.3.2　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

因为 DNMT 分子质量为 98～195 kDa，所以不需要用 Tris-Tricine 缓冲系统分离这些多肽。下述方法描述了传统的应用 0.1% SDS 使蛋白质变性的 Laemmli 不连续凝胶系统。聚丙烯酰胺凝胶中的孔径大小会随着丙烯酰胺的浓度升高而减小，使 DNMT 移动至凝胶中点处的最佳丙烯酰胺浓度是 5%（**注释 1**）。

（1）将 100 μg 的蛋白质在等量的 2×SDS 上样缓冲液（1∶1 *V/V* 稀释）中煮沸 10 min。

（2）将预染色的标准分子质量蛋白质和样品上样到 5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶的点样孔中。

（3）0.75 mm 厚的凝胶在 135 V 的恒定电流下进行电泳，直到溴酚蓝示踪染液到达分离胶的底部（**注释 1**）。

7.3.3　转膜和Western印迹

DNMT可以在湿的或半干的仪器槽中（**图7.1**）通过电泳转膜到硝酸纤维素、聚二氟乙烯（PVDF）或尼龙膜上。推荐使用Hybond-ECL膜（Amersham Pharmacia Biotech，Piscataway，NJ)。孵育时，最好加少量（2～5 mL）样品于可热封塑料袋中并在定轨摇床上进行。如果使用塑料盘，则将体积增加到20～50 mL以确保膜被浸没，戴干净的手套对膜进行操作。

(1) 装配转膜仪器（**图7.1**)，将平衡凝胶、转膜成分和活化的膜（**注释2**）室温下置于转膜缓冲液中30 min，并用玻璃棒或试管去除滤纸、凝胶和膜之间夹杂的气泡。

(2) 4℃下用100 V电压转膜30～80 min（**注释3**)。

(3) 关闭电源，拆解转膜仪器，移去膜并在室温下于TBST溶液中封闭30 min到1 h，轻轻搅动或4℃过夜。封闭液也可选择5%牛奶或5%的牛奶加0.1 mg/mL的牛血清白蛋白（BSA)，室温封闭2 h或4℃过夜。

(4) 在封闭缓液中稀释一抗（依据经验决定稀释倍数；**注释4**)。室温下用一抗与膜杂交至少1 h或4℃过夜。将膜盛放于塑料盘中并用TBST漂洗3次（同时摇动)，每次15 min。在封闭缓冲液中稀释二抗。室温下在一个新的可热封袋子中用稀释的二抗杂交膜30 min到1 h，同时振荡。

(5) **按步骤（4)**，用TBST洗膜3次。

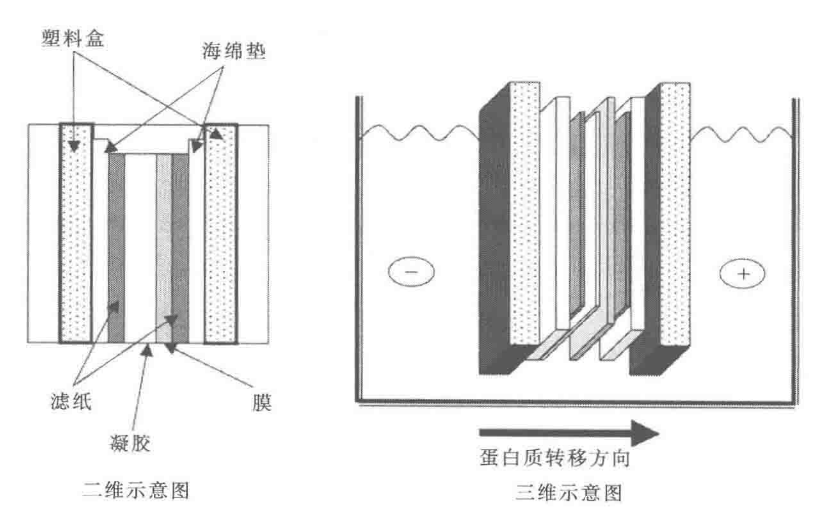


图7.1　免疫印迹转膜装置。图示转膜"三明治"的构成，右图为三维图示，左图为装置中各层的详细二维图示

7.3.4　检测

结合抗原可以用发色体（如BCIP/NBT）或化学发光底物显像。为了提高化学发光敏感性，建议使用HRP偶联的二抗。推荐Amersham ECL（Enhanced Chemilumi-

nescence）系统。这一部分所列出的步骤应在暗室中操作。

（1）去掉残留的洗涤液，垂直地握住膜并将膜的边缘沾到 Whatman 吸水纸上。

（2）将两种底物成分 1∶1 混合于一个小的塑料盘中，将膜带有标记的一面向下置于该混合物中 1 min。

（3）将膜有标记的一面向下置于一张保鲜膜的中心，然后将保鲜膜围绕膜折叠包好，产生一个平的、液体密封。

（4）将膜暴露于放射自显影（X 射线）胶片适当的时间（5 s 到 30 min，根据信号强度来决定）。

（5）将放射性照片显影，将膜在 PBS 中漂洗干净并风干。

7.4　注释

（1）如果对 2 个或 2 个以上的不同分子质量的蛋白质感兴趣，使用梯度凝胶更加有效。在 150 V 电压下电泳 30 min 或根据电源选择电压。但在 200 V 电压下电泳得到的凝胶不适合做免疫印迹。总体来说，对于 60～600 kDa 的蛋白质，凝胶的丙烯酰胺浓度大约为 5%，16～70 kDa 大约为 10%，13～45 kDa 大约为 15%（***8***）。

（2）在含 10%甲醇的转膜缓冲液中室温下平衡凝胶和硝化纤维素膜 15～30 min。这使得凝胶在转膜之前有时间膨胀。如果没有进行这一步，那么凝胶会在转膜过程中膨胀，这样蛋白质就不能准确地转移到膜上。

（3）强烈建议转膜时间少于 80 min。如凝胶暴露于转膜缓冲液更长时间可能导致更多的蛋白质从凝胶溶出。另外，如果使用两个完全转膜仪，要确保电源能够产生准确的电压。有一些旧的电源不足以支持两个设备，完成转膜需要更长的时间，这种情况下免疫印迹的质量通常较差。

（4）一抗可以是多克隆、单克隆、腹水或是抗血清血液。单克隆抗体通常的起始稀释浓度为 1∶1000，但是可以升高至 1∶10 000 或更高。多克隆抗体的稀释倍数可以从浓缩的 1∶1～1∶500。腹水抗体浓度比单克隆抗体更高，所以建议起始浓度为 1∶2000。抗血清很少用于免疫印迹，除非其已通过多肽/柱或硝化纤维素纯化，否则一般背景较高，因此只有其他选择不容易达到时采用。建议在实验开始时测试所有抗体的不同稀释度以找到所需的最精确的稀释度。

（5）二抗通常是购买市售商品，建议在改变稀释度之前首先尝试说明书推荐的稀释度。二抗应基于所用的一抗来选择。如果与膜杂交的一抗多于一种，背景会非常高。因此推荐每次只用一种一抗，或每次检测后使用剥色剂。

参考文献

1. Feng, L., Lin, T., Uanishi, H., Gu, W., and Xu, Y. (2005) Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating stability and activity. *Mol. Cell Biol*. **13**, 5389-5395.

2. Friedler, A., Veprintsev, D. B., Freund, S. M., von Glos, K. I., and Fersht, A. R. (2005) Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. *Structure* **4**, 629-636.

3. Warnock, L. J., Raines, S. A., Mee, T. R., and Milner, J. (2005) Role of phosphorylation in p53 acetylation

and PAb421 epitope recognition in baculoviral and mammalian expressed proteins. *FEBS J.* **7**, 1669-1675.

4. Vaghefi, H. and Neet, K. E. (2004) Decaytlation of p53 after nerve growth factor treatment in PC12 cells as a post-translational modification mechanism of neurotrohpin-incuded tumor suppressor activation. *Oncogene* **49**, 8078-8087.
5. Lopatina, N., Haskell, J. F., Andrews L. G., Poole, J. C., Saldanha, S., and Tollefsbol, T. O. (2002) Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methytransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J. Cell Biochem.* **84**, 324-334.
6. Casillas, M. A., Lopatina, N., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2003) Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically transformed human fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* **252 (1-2)**, 33-43.
7. Fang, M. Z., Wang, Y., Ai, N., et al. (2003) Tea polyphenol (-) -epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* **63**, 7563-7570.
8. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., et al. (1994) Denaturing (SDS) discontinuous Gel electrophoresis: Laemmli gel method, in *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ: **10.** 2A, 4-8.
9. Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Sturzebecher, J., and Stubbs, M. T. (1998) Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. *J. Med. Chem.* **41**, 5445-5456.
10. Rudzinski, T., Mussur, M., Gwiazda, Z., and Mussur, M. (2004) Protease inhibitor leupeptin attenuates myocardial stunning in rat heart. *Med. Sci. Moni.* **10**, BR4-10.
11. Levy, J. H. and Sypniewski, E. (2004) Aprotinin: a pharmacologic overview. *Orthopedics* **27 (6 Suppl)**, s653-s658.
12. Dignam, J. D. (1990) Preparation of extracts from higher eukaryotes. *Methods Enzymol.* **182**, 194-203.

第8章 酿酒酵母的寿命研究

The Chronological Life Span of *Saccharomyces cerevisiae*

Paola Fabrizio，Valter D. Longo

摘要 酵母的寿命研究，即衡量不分裂的细胞群体存活时间，已经成功应用于鉴定衰老调控的关键通路中。这些通路与在更高级的真核细胞中调控寿命的通路有显著的相似性，提示我们寿命取决于基因的活性和拥有共同进化起源的信号通路。因此，单细胞的酿酒酵母是一种简单模型体系，能够为衰老遗传学和分子生物学提供深入研究的途径。我们在这里介绍测量酿酒酵母寿命的标准步骤，包括正常组的和热量限制范式。

关键词 老化；Sch9；胰岛素/IGF-I；热量限制

8.1 引言

理解衰老过程，并研究如何阻断或延缓衰老过程是现代科学中备受关注且极具挑战的课题。过去的十年里，一些寿命调控相关的基因被鉴定出来，更为重要的是，这些基因都指向了一个部分保守的营养/胰岛素/胰岛素样生长因子（IGF)-I 样通路，它存在于酵母到哺乳动物的体内，是衰老过程的一个主要的调节因子。在酵母体内，两个营养感应通路的下调，即 Ras/蛋白激酶 A（PKA）和 Sch9 通路，会提高抗逆性并延长寿命高达 3 倍（*1*）。类似的效果可以通过降低线虫、果蝇和小鼠体内胰岛素/IGF-I 通路的活性来获得（*2*）。酿酒酵母作为哺乳动物衰老研究中一种有价值的简单的真核细胞模型系统，其应用有诸多优点，最关键的是酵母具有相对短的寿命并可以利用直接的遗传学和基因组学技术进行研究。年代学寿命不同于研究较完善的复制寿命，后者衡量的是单个酵母母细胞的复制潜能（*3*）。与更高等的真核生物相似，酵母的年代寿命是测量一个群体的酵母生物体在非分裂条件下保持活力的时长。为了提供反映自然环境中发生的条件的范式，年代寿命的测量中，细胞生长在含葡萄糖的培养基中，然后继续在该培养基中培养进入后分裂相（生长期之后初始的新陈代谢水平极高的时期）和一个稳定相（接下来的低代谢时期）直到失去分裂能力或死亡。这可能被看作是饥饿所导致的死亡，但却又并非如此，因为在生长期的后期酵母细胞储存备用营养，因而营养并未成为限制因素（P. fabrizio，未发表的结果)。在后分裂相和稳定相中生存是野生环境中大多数微生物不可避免会遇到的情况（*4*）。事实上，在葡萄提取物中孵育的实验室品系与那些我们用于年代寿命研究的在 SDC 培养基中孵育的相同品系在寿命轨迹上有显著的相似性（*5*）。与后分裂相细胞类似，稳定期细胞具有对细胞应激的高抗逆性和糖类的累积等特征（*4*）。如前所述，稳定期细胞的新陈代谢水平低。只有少部分二倍体细胞进入休眠芽

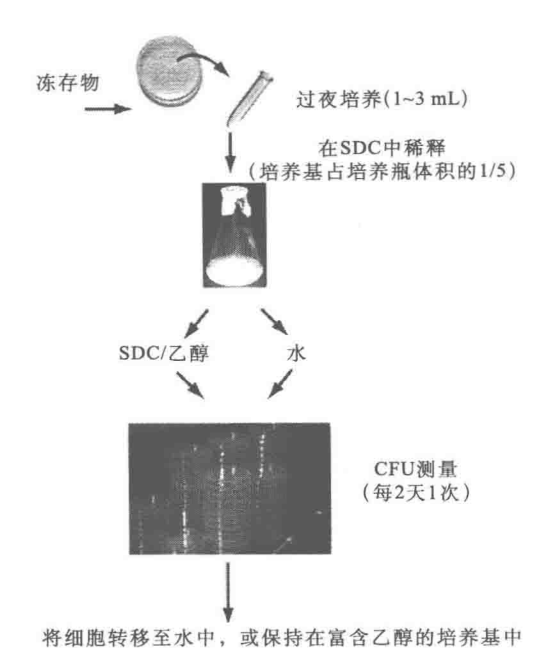
孢期，一种新陈代谢水平更低且存活期非常长的状态。因此，取决于生存条件，酵母可以以至少3种不同的时相存活并增龄：①高代谢水平的后分裂相。②低代谢水平的稳定相。③极低代谢水平的芽孢期。酵母中，这3个时相都受Ras/PKA、Tor和Sch9通路的影响，这些通路通过调控一般的和特定的基因组合来调控年代寿命（Ras/PKA/Tor）（**参考文献6**和M. Wei，尚未发表的结果）。在秀丽线虫（*Caenorhabditis elegans*）中进化出一种类似的长期应对极端饥饿状态的策略，即成为持久幼虫，部分由调节寿命的通路调控（胰岛素/IGF-I样）（***7***）。因此，我们或许可以假设寿命调控机制最初是在微生物体中进化出来的，目的在于推迟繁殖以应对饥饿。

在实验中，通常是通过在丰富培养基（YPD）中生长的酵母细胞群，直到达到饱和并将细胞维持在同一个培养基内不补给任何营养，以诱导细胞进入稳定期。在这样的情况下，酵母在含葡萄糖的培养基中生长迅速，停止生长后经历双峰转换，并从发酵代谢转变为呼吸性代谢，细胞生长速率很低，并最终经历细胞周期停滞，进入低代谢稳定期（***4***）。正常情况下，稳定期的进入大约发生在双峰转换之后的3～6天，酵母群体在生存能力下降之前可能存活长达3个月（***8***）。尽管YPD普遍用于年代寿命的测量（***9***），但我们注意到这种培养基诱导细胞存活率呈现很大的波动，这可能是基于随时间推移，部分停滞的酵母细胞群被激发，利用死去的酵母的营养重新进入细胞周期（V. D. Longo，未发表的结果）。因此，为了监控酵母的年代寿命，我们大多使用合成的完全培养基（SDC），它只有在绝大多数细胞群体已经死亡后，才表现出促进容易探测到的细胞再生长。在一些遗传背景下，在SDC中孵育会促进一个更短但大多是高代谢的生存期出现（5～6天）（后分裂时相），在这之后酵母会迅速死亡（***10***）（**图8.1**）。也可以选择像我们在水中进行年代存活实验［严格热量限制（CR）］，在群体达饱和后将细胞从SDC转移到水中（**图8.1**）。水孵育法模拟了极度饥饿的情况，这对于酵母来说是经常会遇到的（如当它们从果实上被雨滴冲下去时）。与孵育在YPD上的酵母相似，转移到水里的酵母会进入稳定期，表现出比维持在SDC上时更低的代谢水平和更长的存活时间。这种CR的极端形式应该能够作为一种强有力的模型，用于理解已被很好地研究过的CR在所有模式生物体上的寿命延长作用的机制（***2***）。重要的是，在SDC中延长寿命的突变在水中也表现出相同的效果，提示了Ras或Sch9通路之一的下调引起了寿命延长的变化，这与CR所引起的效果有部分重叠。

8.2　材料

（1）SDC液体培养基：0.18％酵母氮基础，不含氨基酸和硫酸铵（Becton，Dickenson and Company），0.5％硫酸铵，0.14％ NaH_2PO_4，0.173％完全氨基酸混合物（稍后讨论）。将所有组分完全溶于水中并用NaOH调节pH至6.0。高压灭菌，使用前加入右旋葡萄糖至终浓度为2％（稍后讨论）。

（2）含腺嘌呤和尿嘧啶的完全氨基酸混合物（Sigma Aldrich）：腺嘌呤80 mg/L，80 mg/L尿嘧啶，80 mg/L色氨酸，80 mg/L组氨酸-HCl，40 mg/L精氨酸-HCl，80 mg/L甲硫氨酸，40 mg/L酪氨酸，1200 mg/L亮氨酸，60 mg/L异亮氨酸，



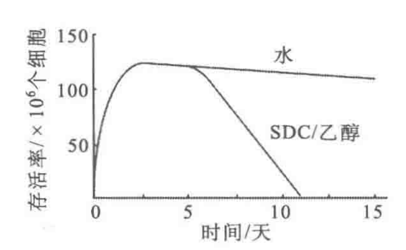


图 8.1　年代寿命测量。将少量菌落从一个新鲜的平板中接种到 1～3 mL 的 SDC 中。过夜培养要在 10～50 mL 的 SDC 中稀释。2～3 天之后，细胞分裂停止，乙醇在培养基中积累。在第三天，酵母或者保持在这个富含乙醇的培养基中，或转移到水中。每 2 天通过稀释酵母培养物，并将适当数目的细胞铺在丰富培养基（YPD）平板上监控菌落形成单位（CFU）以测量细胞存活率。当酵母被转移到水中后，每 2 天冲洗 1 次培养物以避免可能由于死去的酵母菌释放的营养积累而引起的细胞分裂

60 mg/L赖氨酸-HCl，60 mg/L 苯丙氨酸，100 mg/L 谷氨酸，100 mg/L 天冬氨酸，150 mg/L 血管紧张素，200 mg/L 苏氨酸，400 mg/L 丝氨酸。这是最初配方的改进版（***11***）。

（3）酵母提取物/蛋白胨固体培养基（YPD）：10 g/L 细菌用酵母提取物（Becton，Dickison and Company），20 g/L 的细菌用蛋白胨（Becton，Dickison and Company），20 g/L 细菌用琼脂（Becton，Dickison and Company）。溶于水中并高压灭菌。加入右

旋葡萄糖至终浓度为 2%。混合均匀并铺板。

(4) 20%（*m/V*）葡萄糖储备液。

(5) 高压灭菌过的 18 MΩ Milli-Q 级水用于所有培养基的制备、水中的实验以及 CFU 检测中的稀释。

(6) 100 mm×15 mm 培养皿（VWR)。

8.3 方法

8.3.1 在 SDC/乙醇中的年代寿命（后分裂时相）

(1) 将冻存物的一小部分在 YPD 平板上划线并 30℃孵育 2～3 天（**注释 1**)。

(2) 接种若干个菌落（4～5 个）到 1～2 mL SDC 培养基上，生长过夜。在 10～50 mL SDC 中稀释过夜的培养物至初始密度为 1×10^6～2×10^6 个细胞/mL（OD_{600} 为 0.1～0.2)。30℃下在容积/培养基比例为 5∶1 的细颈瓶中孵育，在 220 r/min 下摇匀（**注释 2～3**)。

(3) 3 天之后，开始通过测量一个单独的酵母细胞/生物体形成菌落的能力［菌落形成单位（CFU)］来监测存活率（**注释 4**)。正常情况下，培养物要在无菌蒸馏水中连续稀释至达到 $1:10^4$ 的稀释度，而且 10 μL 相同的稀释液要双份铺于一个 YPD 平板的两半。必须特别仔细操作以避免稀释的培养物扩散过标记分割平板两半的线。通常使用每个培养物两个稀释物副本以减少由于手工误差导致的上下波动。CFU 在 2～3 天之后计数（**注释 5**)。CFU 在第三天的数值被看作是初始的存活率（100%存活）用于确定年龄依赖的存活率百分比（**注释 6**)。

(4) 每 48 h 监测 1 次 CFU，根据死亡率调整稀释因子和铺板体积。继续直到存活率达到 1%，记录近似的最大存活时间（**注释 7～8**)。

8.3.2 CR 下的年代寿命：水中孵育，稳定期

(1) 如 8.3.1 节，**步骤（1～3）**所述操作。

(2) 室温下在灭菌的聚丙烯管中 1400 *g* 离心 5 min 收获细胞。在与原培养物同等体积的蒸馏水中重悬沉淀并离心，同前所述（**注释 9 和 10**)。

(3) 再洗涤细胞 2 次，用与最初的 SDC 培养物同等体积的无菌蒸馏水重悬细胞。

(4) 用无菌水润洗最初用于孵育的细颈瓶，将培养物倒入其中。

(5) 每 48 h 重复**步骤（2）～（4）**。

(6) 如上所述每 48 h 一次监测 CFU。

8.4 注释

(1) 最理想的活力实验应该用已经从冻存物中复苏，并且仅在 YPD 平板上生长 2～3天的酵母开始进行。在 4℃下孵育主皿，特别是长时间孵育（> 1 周）可能显著影响存活率。

(2) 我们通常在实验开始时接种几个菌落而不是单独一个，以减小随机成分对存活率的影响。在 SDC 上进行的寿命研究所选择的细颈瓶的大小要根据所用品系的预期寿命而定。对于长时间的实验（> 3 周）推荐使用大一些的细颈瓶（250 mL）以避免培养基蒸发。

(3) 实验通常在 30℃下进行。更高温度（37℃）孵育会引起细胞应激并显著的降低酵母活力（V. D. Longo，未发表的结果）。

(4) 为了检测 CFU 的丧失是否为监测生存能力丧失的一种合适的系统，我们测量了死亡细胞和受损的野生型 DBY 746 以及长时间生存的突变体释放到培养基的蛋白质的浓度，发现蛋白质的释放和 CFU 的数量呈负相关（***10***）。

(5) 老年细胞重返细胞周期比年轻细胞要慢得多。在生存率实验的最后阶段在 30℃下再多孵育 YPD 平板 1 天，以避免低估生存率。

(6) 第三天时 CFU 的数目被选定为初始存活率（100%），我们的野生型品系 DBY746 和 SP1 种群密度 3 天后一般不会再增长，这暗示了绝大多数细胞已经停止了分裂。使用生存期特别短的品系和突变体时，建议从第一天起就每天监测存活率。

(7) 我们的结果表明，大约 50%的研究中，99%以上的在 SDC 中孵育的野生型 DBY746 和 SP1 酵母菌死亡后，适应性更好的亚群能够利用死亡细胞所释放出的营养物质继续生长（***5***）。在这样的情况下，再生长能够很容易的被监测到，因为其生存率能够增加 10～100 倍。但也不能排除一小部分培养的细胞在存活率到达 1%之前就重新开始分裂的可能性。假如这一事件在大多数群体仍具活力的实验早期阶段就发生，那可能很难从"正常的"存活率起伏中将它分辨出来，并且将有可能干扰实验结果。当我们怀疑再生长有可能发生时，我们转向水的范式。事实上，水中孵育并通过 3 个冲洗步骤除去死亡生命体释放的营养物质，能最大限度地减小长时间生存中再生长的机会。

(8) 在一些遗传背景中（即 BY4741）存活率通常在达到 5%～10%后就保持稳定。尚不清楚这是否由于对极长寿的亚群体的选择，或最有可能的是一种类似与大肠杆菌"稳定"培养中的现象，以部分群体能够利用死去的生物体释放的营养物质而再生为特征（***12***）。

(9) 对于水中生存率实验，我们建议用在 SDC 中培养 3 天的，已经达到通常能达到的 OD_{600}平均值（对于 DBY746 和 SP1 是 14～15）的培养物开始实验。我们注意到在 SDC 中生长不理想的酵母菌群体在水中的存活率会显著降低。

(10) 我们已经观察到对在 SDC 中孵育的酵母的操作相对简单而且污染的机会很小，而用水培养的污染风险非常大。这一部分是由于冲洗步骤引发了更多的对培养物的操作，也由于 SDC 培养物在 3 天后达到低 pH（3～3.5），很有可能是通过抑制污染物的生长或是杀死污染物实现保护作用（P. Fabrizio，未发表的结果）。为了降低污染风险，我们建议每次进行冲洗步骤时都用未开瓶的灭菌水。

参考文献

1. Fabrizio, P., Pozza, F., Pletcher, S. D., Gendron, C. M., and Longo, V. D. (2001) Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* **292**, 288-290.

2. Longo, V. D. and Finch, C. E. (2003) Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science* **299**, 1342-1346.

3. Bitterman, K. J., Medvedik, O., and Sinclair, D. A. (2003) Longevity regulation in Saccharomyces cerevisiae: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 376-399.

4. Werner-Washburne, M., Braun, E., Johnston, G. C., and Singer, R. A. (1993) Stationary phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Rev.* **57**, 383-401.

5. Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., et al. (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **166**, 1055-1067.

6. Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., and Werner-Washburne, M. (2004) "Sleeping Beauty": quiescence in Saccharomyces Cerevisiae. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 187-206.

7. Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T., and Kenyon, C. (1995) The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **141**, 1399-1406.

8. Lillie, S. H. and Pringle, J. R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in Saccharomyces cerevisiae: responses to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **143**, 1384-1394.

9. Pedruzzi, I., Burckert, N., Egger, P., and De Virgilio, C. (2000) Saccharomyces cerevisiae Ras/cAMP pathway controls post-diauxic shift element-dependent transcription through the zinc finger protein Gis1. *Embo J.* **19**, 2569-2579.

10. Fabrizio, P., Liou, L. L., Moy, V. N., et al. (2003) SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**, 35-46.

11. Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991) in *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* Vol. 194. Academic, San Diego.

12. Zambrano, M. M. and Kolter, R. (1996) GASPing for life in stationary phase. *Cell* **86**, 181-184.

第9章　酵母细胞的热量限制与寿命检测

Caloric Restriction and Life Span Determination of Yeast Cells

Oliver Medvedik，David A. Sinclair

摘要　用称为热量限制（CR）的饮食延长啮齿动物的寿命已经被人们认识70年了（*1*），CR也可以广泛延长其他物种的寿命，从单细胞的生物体（*2*，*3*）到无脊椎动物（*4*），而且很可能对灵长类动物也有效（*5*）。出芽型酿酒酵母菌是研究对进食量作出反应的寿命决定通路的一种有用的模型。这里我们将探讨如何从热量上限制酵母菌并判定单个酵母菌母细胞的增殖寿命的方法，以及如何在rDNA基因座上测量重组频率，还有如何分离并分析被称为染色体外rDNA环（ERC）的环状DNA，它是引发酿酒酵母衰老的一个重要因素（*6*～*8*）。

关键词　寿命；老化；Sir2；ERC；组蛋白去乙酰化酶；磁性分选；显微操作

9.1　引言

测量如人类以及大多数哺乳动物等生存期较长的生物体寿命是一项极耗时的工作，因此，研究者们转而研究寿命短的更简单的生物体，以理解衰老过程并鉴别可能调控衰老过程的基因和小分子。

延长哺乳动物的寿命是可以实现的，一种称为热量限制（CR）的简单的饮食处理可以延长啮齿动物的寿命约40%。问题在于：这种作用效果的潜在原因是什么？最近几年，出芽酵母，即酿酒酵母已成为理解CR作用的主要途径之一。如今，已报道20多个酵母的长寿保证基因（LAG），而且我们已对CR如何作用有了很好的认识（*9*）。

有两种途径可以确定酵母的寿命，一个是培养处于稳定期的酵母，考察其维持活力的天数，这称为“年代寿命”（*10*）。也可以选择根据单个细胞的分裂次数来确定其寿命，这称为“复制寿命”（*11*）。就复制寿命而言，酵母衰老的原因是染色体外rDNA环（ERC）的形成（*12*）。当酵母分裂时，高度重复的rDNA基因座倾向于发生重组，这导致含有起始复制点的环状DNA切除（*13*）。这个含有复制起始点的游离DNA接着可以自主复制到超出细胞基因组的水平。母细胞最终死亡的发生可以通过关键因子的标定来推测。另外，细胞分裂时ERC不对称地分离，被局限在母细胞中，这使得子细胞逃离同样的命运（*9*）。

尽管酵母是一种简单的真核生物，但确定其复制寿命并非一项简单的工作。需要研究人员熟练掌握显微镜和显微操作，还要有相当多的耐心。只有靠时间的积累才能熟练掌握这项技术，通常初学者无法在第一轮实验中连续获得可靠的数据。本章介绍的所有

操作涉及酵母品系 W303AR5 MATa *ade2-1*，*leu2-3*，*112*，*canl-100*，*trpl-1*，*ura3-52*，*his3-11*，*15*，*RDN1*::*ADE2*。这个品系在 25S rDNA 位点整合了 *ADE2* 基因，使其也可用于重组分析。这个品系也可以很好地响应 CR，达到大约 20%的寿命延长（***15***）。用于复制寿命分析的其他品系的列表以及所报道的平均和最大复制寿命的值参见 Bitterman 等的综述（***9***）。

9.2 材料

9.2.1 酵母复制寿命分析的准备工作

（1）2.2×加入了酵母提取物/蛋白胨（YEP）的培养基：22.2 g/L 细菌用酵母提取物（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ），44.4 g/L 细菌用蛋白胨（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ）溶于水中并用 0.22 μm 的真空过滤器过滤灭菌。向培养基中加入 40 mL/L 0.5% 腺嘌呤溶液，和 20 mL/L 1%的氨基酸溶液（**注释 1～3**）。

（2）4% 的琼脂：细菌用琼脂（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ）：8 g琼脂加入到 200 mL 的水中并高压灭菌。

（3）18 MΩ Milli-Q 水，用于所有培养基的制备。

（4）培养皿：100 mm×15 mm（VWR，Bridgeport，NJ）（**注释 4**）。

（5）氨基酸和腺嘌呤（Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）储备液（*m/V*）：制备 0.5%腺嘌呤，1%尿嘧啶，1%色氨酸，1%组氨酸，以及 1%亮氨酸水溶液，并用 0.22 μm的真空过滤器过滤灭菌。上述组合是补给营养缺陷型，特别是针对 W303AR 品系的酵母的辅源营养，其他的品系需要不同的氨基酸。

（6）1.05×的 YEP：10.5 g/L 细菌用酵母提取物（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ），21.1 g/L 细菌用蛋白胨（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ）溶于水中并高压灭菌。补充的添加物同高压灭菌后的 2.2×YEP 培养基，但溶液的用量减半。

（7）40%（*m/V*）葡萄糖储备液。

（8）解剖针套装：（Cora Styles Needles ‘N Blocks，cat. no. 1025，105；Cypress Pt.，Hendersonville，NC，phone：828-629-9528）。

9.2.2 磁性分选衰老酵母

（1）磷酸盐缓冲液（PBS）：10×的储备液使用 1.37 mol/L NaCl，27 mmol/L KCl，43 mmol/L Na_2HPO_4，14 mmol/L KH_2PO_4，必要时用 HCl 校正至 pH 7.4，然后立即高压灭菌。用无菌水 1∶10 稀释得到 1×工作液。

（2）EZ-链接的生物素：磺酸-NHS-LC-生物素（Pierce，Rockford，IL）。

（3）链霉亲和素包裹的顺磁性铁珠（PerSeptive Biosystems，Framingham，MA）。

（4）Calcofluor 荧光增白剂 28（Sigma，St. Louis，MO）。

9.2.3　分离 ERC

（1）1×TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；1 mmol/L EDTA，pH 8.0。

（2）山梨醇溶液：0.9 mol/L 山梨醇（Fisher）；0.1 mol/L Tris-HCl，pH 8.0；0.1 mol/L EDTA；用水制备并用 0.22 μm 的真空过滤器过滤灭菌。

（3）细胞壁溶解酶溶液：在山梨醇溶液中溶解 0.3 mg/mL 的细胞壁溶解酶（20 000 U/g;ICN Immunobiological，Irvine，CA），4℃保存。

（4）β-巯基乙醇。

（5）10%（*m/V*）十二烷基硫酸钠（SDS）。

（6）5 mol/L 乙酸钾溶液（不调节 pH）。

9.2.4　ERC 分析

（1）随机引物 DNA 标记试剂盒（Roche Diagnostics，Indeanapolis，IN）。

（2）ProbeQuant™葡聚糖凝胶 G-50 柱（Amersham Pharmacia，Piscataway，NJ）。

（3）dCTP^{32}（Perkin Elmer，Boston，MA）。

（4）预杂交缓冲液：100 μL 煮沸的鲑鱼精 DNA（5 mg/mL ssDNA 储备液），1 g 硫酸葡聚糖，1 mL 10% SDS，0.56 g NaCl 溶于 10 mL 水中。65℃下加热 30 min 使盐溶解到溶液中。

（5）10 × TBE 电泳缓冲储备液：0.89 mol/L Tris 碱，0.89 mol/L 硼酸，20 mmol/L EDTA，pH 8.0。1∶10 稀释得到 1×的工作液。

（6）0.4 mol/L NaOH 溶液。

（7）0.25 mol/L HCl 溶液。

（8）20×SSC 储备液：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 枸橼酸钠。用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 7.0。2×的工作液是通过 1∶10 用水稀释而得。

（9）尼龙膜（Perkin Elmer，Boston，MA）。

（10）冲洗缓冲液：2×SSC 0.1% SDS（低严格性）于室温，1×SSC 0.1% SDS（中等严格性）于 60℃，0.1×SSC 0.5% SDS（高严格性）于 60℃，0.1×SSC（简单冲洗）于室温。

9.2.5　重组分析

（1）1.05×YEP：如前所述同样方法制备。

（2）2.2×YEP：不同于用于寿命检测平板所用的 2.2×YEP 的制备，此储备液中不加入腺嘌呤和组氨酸。此溶液可以高压灭菌，而不用过滤灭菌，其他制备方法同前所述。

（3）3% 琼脂：细菌用琼脂（Becton，Dickison and Company，Frankin，NJ）：6 g 琼脂加入 200 mL 的水中并高压灭菌。

（4）大号培养皿：150 mm×15 mm（VWR，Bridgeport，NJ）。

9.3 方法

9.3.1 酵母复制寿命分析的准备工作

(1) 在开始实验的前一天，将酵母在含有与寿命检测中使用的培养基相同的琼脂板上划线，我们通常使用含有终浓度为2%葡萄糖的平板供酵母正常繁殖。对于CR分析，使用相同的储备液制备平板，葡萄糖的终浓度为0.5%。酵母要尽可能新鲜，如果直接从冻存物中取得，需要连续划线至少2天来复苏细胞。只能使用点样后24 h之内的培养板，也就是说，酵母要尽可能新鲜并且生长活跃。

(2) 使用无菌牙签，从前一天晚划线处转移很少量（肉眼几乎不可见）至一个用于寿命分析的新鲜的平板上。酵母在平板上应该呈几乎看不到的点状。让转移后的细胞在30℃下再生长3～5 h。

(3) 当倒置的培养板固定在显微镜载物台上之后，用一根光纤针尖吸出一簇细胞，细胞量以针尖可以容纳的为准，大约距板上细胞点≥1 cm。可能需要重复多次以转移足够多的细胞。

(4) 找到相对小而且看上去健康的细胞，也就是说呈圆形且无异常形态。用针的尖端排列40个细胞，分为5组，各接种一个单独的菌落。在每个细胞间留有足够的空间，使得在10×物镜下每个视野中不超过3～5个细胞（**图9.1**）每组的5个细胞可以通过用针刺穿到琼脂中来标记，也就是说，用1个刺穿、2个刺穿、3个、4个，一个合适的角度或其他能够帮助你找到并记录板上细胞列的方法都可以。接下来，在记录本上标记同样的将菌落划分为5组的模式（**注释5**）。

(5) 在排列好细胞之后，移走显微镜台上准备用于寿命检测的培养板，并先用石蜡密封培养板之后将其在30℃下孵育1～2 h，以防止水分丢失。将平板放回显微镜下时，该酵母已经历了1或2次分裂（**注释6和7**）。

(6) 用针分离细胞并留下较小的出芽细胞，这些刚开始生长的初始母细胞将成为之后检测中的母细胞。弃去剩余的已分裂的细胞，将其移到左边，距离初始母细胞约1/3的视野。并非所有的细胞都适合在同一时间分离，因此，可能需要在分离了其他细胞之后再等待30 min到1 h。

(7) 在30℃下孵育封好的平板1～2 h。将平板转移回显微镜下，从此时开始，从最初的初始母细胞中去除较小的子代芽细胞，并记录每列母细胞发生分裂的次数（**注释8～10**）。只对物理上与母细胞分离的子代细胞进行计数，忽略那些第二次显微镜检时仍保持连接状态的细胞。需注意的是，酵母轴向分裂，一个附着在母细胞上的子细胞可能形成一个出芽，或者不出芽。经过2次分裂，母细胞中可最多分出4个子代出芽细胞。根据指数分裂的速度可以很容易地看出4个子细胞的形成可能导致需要从母细胞的附近挑出多达16个细胞。因此，建议分裂次数不宜超过4次，否则可能很难辨认出母细胞。此外，同一位置有过多的细胞可能造成养分的过度消耗。

(8) 重复**步骤(7)**一整天。母细胞会随着分裂逐渐变大，最终更容易与子代细胞区分开（**注释11和12**）。随着母细胞的老化，其分裂速度也将变慢，一些老

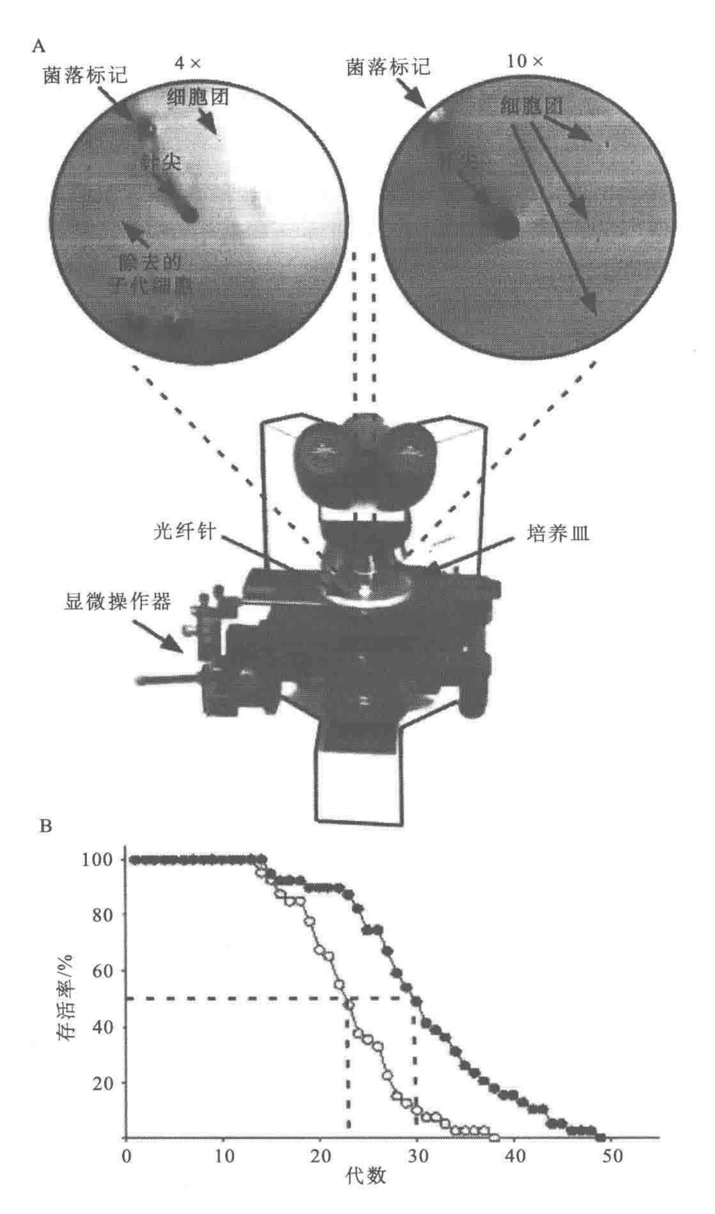


图 9.1　复制寿命检测中，使用 25 μm 或 50 μm 的光纤针将单个酵母细胞接种在琼脂板上，排成一列。在 10 倍目镜下进行酵母的显微操作。放置初始母细胞之后，用针除去随后出芽形成的子细胞，使其脱离母细胞。记录每个母细胞在每次显微操作中经历的分裂次数

化的细胞分裂周期长达 4 h（**注释 13**）。如果一个细胞 8 h 不分裂，则认定其为死细胞。

(9) 当所有的细胞已经死亡（10～14 天），将其复制寿命绘制成曲线。每一列与特定细胞的分裂次数相吻合，数量记为活细胞占全部细胞的百分比（%）。例如，实验测

定开始时，即 0 次分裂后有 100%的细胞存活，而在最后一个母细胞最后一次分裂后，有 0%的细胞存活。

9.3.2　衰老酵母细胞的磁性分选

（1）在 5 mL 1×YPD 上孵育酵母，30℃，200 r/min 生长过夜。

（2）第二天早上，在 50 mL 1×YPD 中重悬足够数量的细胞，使得 600 nm 波长下的光密度（OD_{600}）在同一天达到大约 1.0（2×10^7 个单倍体细胞/mL）。这通常需要将约 1 mL 过夜培养物稀释到 50 mL 1×YPD 中。起始的 OD_{600} 值应为 0.15～0.20。

（3）当 OD_{600} 达到约 1.0 时，用临床用的离心机 4000 r/min 离心 5 min 收集细胞。用 1 mL 无菌 1×PBS 洗涤细胞。再用 1mL PBS 重悬细胞并转移到离心管中。

（4）这些细胞现在已经准备好用于生物素标记。取出冻存的 EZ-链接的生物素，室温下解冻。注意它对水分非常敏感。解冻后，在每 1×10^8 个细胞中加入 8 mg 无菌 EZ-链接的生物素。室温下轻轻摇动细胞 15 min。

（5）用 1 mL 1×PBS 洗细胞 7 次，以除去过量的生物素标记。

（6）在 1 mL YPD 中重悬细胞，用血球计数板测定细胞密度。我们使用 Bright-Line 血球计数板（Hausser Scientific；Horsham，PA）。在 4 L 新鲜 1×YPD（20 min 高压灭菌）中加入 2×10^8 个细胞，于摇床上 30℃过夜。

（7）5000 r/min 离心沉淀细胞，彻底吸去 1×YPD 培养基，在 20 mL 冷的 1×PBS 中重悬细胞，并将细胞置于冰上。

（8）用 1×PBS 洗磁珠 2 次（**注释 14**）。每 1×10^8 个细胞加入洗过的 250 μL 磁珠悬液。在冰上孵育 2 h，不时地涡旋振荡，使得生物素标记的细胞结合到磁珠上。分选操作必须在 4℃房间中进行。向 16 mm×150 mm 的玻璃培养管中加入相同体积重悬后的包被了磁珠的细胞，并插到磁性试管架上。我们使用 BioMag 管架（Polysciences Inc.；Warrington，PA）进行磁性分离。等待 15～20 min 直到磁珠包被的衰老细胞移到磁铁所对的管端。用 10 mL 吸管小心地去除那些仍然留在溶液中的年轻细胞并保存溶液。在各管中分别添加等体积的冷的 1×YPD 培养基使管内凹液面到达磁铁顶端，等待 15～20 min 以进行磁性分离。重复**步骤（6）**，每次都用冷的 1×YPD 培养基并且轻轻涡旋振荡以重悬磁珠包被的细胞。重复此步骤 8 次，使用血球计数板检查产率，回收率一般是起始细胞的 50%。

（9）芽痕计数：首先向 100 μL 1×PBS 中加入 20 μL 细胞，添加少量 Calcofluor 荧光增白剂，室温孵育 5 min。加入 1 mL 1×PBS，在微量离心机中 6000 r/min 离心 20 s。用 1 mL 1×PBS 洗细胞 1 次后，再次沉淀细胞并在 100 μL 1×PBS 中重悬。单次分选后多数细胞带有 4～9 个芽痕。

（10）将约 10 μL 细胞滴加到载玻片上，盖上盖玻片。用紫外（UV）荧光显微镜观察被染色的芽痕。如果细胞分选是成功的，衰老细胞群体中平均每个细胞上的芽痕数量应该比年轻细胞多 5～12 个（**图 9.2A**）。

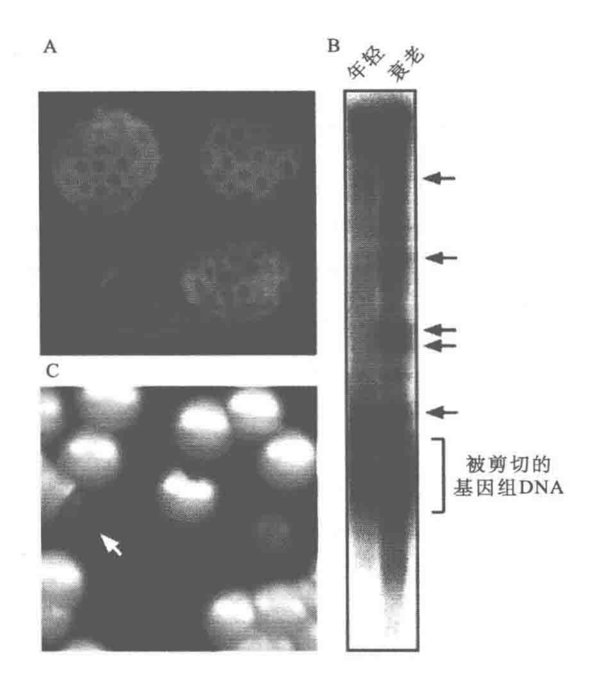


图 9.2 (A) 衰老的酵母被 Calcoflour 染料染色。每个蓝染色环是一个“芽痕”，即细胞壁表面每个分裂位点的甲壳素沉积；(B) 对年轻和衰老酵母细胞核 DNA 的 Southern 印迹分析，使用放射性标记的核糖体 DNA 序列探针。箭头指向 ERC，它们在衰老细胞中呈指数积累；(C) 腺嘌呤缺陷型琼脂平板，箭头指向在第一次细胞分裂时发生 ADE2 标志物自发缺失的细胞菌落。结果是在缺失这个标记基因的菌落出现积累红色染料的半扇形区域

9.3.3 分离 ERC

(1) 在 500 μL 山梨醇溶液中重悬细胞。加入 25 μL 细胞壁溶解酶和 50 μL 0.28 mol/L β-巯基乙醇（20 μL β-巯基乙醇溶于 980 μL 水）。30℃孵育 15～45 min，孵育时间视酶的活力而定。为监测产生原生质的效率，即细胞壁消化的效率，向 10 μL 细胞中加入 2 μL 10% SDS，如果显微镜下观察到 85%～95%的细胞都已裂解，则可以进行下一步的操作（**注释 15**）。

(2) 加入 80 μL 10% SDS，上下颠倒数次，65℃孵育 20 min。此时溶液变得黏稠。

(3) 加入 200 μL 5 mol/L 乙酸钾溶液。上下颠倒数次，并置于冰上至少 30 min。此时应形成白色沉淀。

(4) 高速离心 3 min。弃上清液并加入 1 mL 100% 乙醇。上下颠倒数次以混匀，并在最高速离心 10 min。

(5) 将 DNA 沉淀在 300 μL TE 中重悬。加入 1 mL 10 mg/mL 的 RNase，37℃孵育 30 min。

(6) 加入 1 mL 冰冷的 100%乙醇以沉降 DNA，最高速离心 10 min。弃去乙醇后，

真空离心以干燥沉淀，并将沉淀重悬于 50 μL TE 中。重悬后的 DNA 沉淀可以 −80℃ 保存。

9.3.4　分析 ERC

（1）对 ERC 的分析主要涉及 Southern 印迹法杂交以及使用带有放射性 rDNA 片段的探针与 ERC 杂交（**图 9.2B**）。用 1×TBE 配制一大块 1%的琼脂糖凝胶，上样，同时加入 DNA 分子质量标准，30 V 电压跑电泳过夜。

（2）凝胶在 500 mL 含有 25 μL 10 mg/mL 溴化乙锭溶液中浸泡 30 min，紫外照相，需带有标尺。

（3）用水洗凝胶 30 s，然后在 0.25 mol/L 盐酸的水溶液中浸泡凝胶 30 min，同时轻轻摇动。

（4）再次用水冲洗凝胶，在 1 L 0.4 mol/L NaOH 溶液中浸泡 20 min，同时轻轻摇动，使 DNA 发生变性。

（5）组装转膜装置。转膜缓冲液为 0.4 mol/L NaOH。转膜装置包括一个装有 2/3 体积缓冲液的浅玻璃托盘，用玻璃平板部分盖住顶部，两侧各留 1～2 英寸①的距离。将 Whatman™ 3MM 滤纸剪成长方形，在转膜缓冲液中润湿，盖在置于顶部的玻璃平板上，两端要留有一定长度，足以通过 1～2 英寸的间隙浸在转膜缓冲液中。以此作为转膜中的吸液芯，芯的两侧应比尼龙转印膜宽 1 英寸。

（6）沥干凝胶，轻轻放在吸液芯上，用玻璃吸管轻轻排出可能被困在凝胶下方的气泡。

（7）剪下一块与凝胶大小相对应的尼龙转印膜。将膜在转膜缓冲液中润湿，置于凝胶顶部，用吸管除去所有气泡。

（8）剪 3 块与尼龙膜同样形状的 Whatman 3MM 滤纸，边缘比尼龙膜略小几毫米。将其浸在转膜缓冲液中并放置在尼龙膜和凝胶上，每层滤纸放好后，再次使用玻璃吸管仔细排除气泡。

（9）将一摞 3～4 英寸高的纸巾放置在凝胶上面，在这叠纸巾上放一个玻璃平板，在上面加较轻的重量以稳定平板，用气泡水平仪确保平板完全水平。

（10）包好转移装置露在外面的部分，即用保鲜膜包好吸液芯，以防止转膜缓冲液蒸发。然后转膜 12 h。

（11）用 2×SSC 润洗尼龙膜，以除去残留的琼脂糖。用强度为 0.12 Joules/cm^2 的紫外线照射湿润的膜，这相当于在使用 Stratagene 紫外交联仪时设置为 1200。

（12）加入 10 mL 预杂交缓冲液到 200 mL 容量的圆柱形玻璃杂交瓶（Boekel Scientific）中。将膜放入瓶中，并在 65℃下孵育 1 h，同时旋转瓶子。

（13）按试剂盒说明书制备放射性探针。反应完成后，用 1×TE 将探针反应体积加到 50 μL。3000 r/min 离心 1 min 制备 Sephadex G-50 柱，使微珠基质变得紧实。将 50 μL探针反应物加到制备好的 Sephadex G-50 柱上，3000 r/min 离心 2 min。

---

① 1 英寸＝2.54 cm，后同。

(14) 煮沸放射性标记的DNA探针5 min并小心将其放入装有膜和预杂交溶液的杂交瓶中，65℃孵育过夜。

(15) 用冲洗缓冲液洗膜，直到计数减少到只高于背景几倍。确切的洗涤时间必须根据操作人员的经验确定。结合的探针现在可以使用Phosphorimager磷屏成像系统或X射线胶片分析。

9.3.5 重组分析

(1) 首先将细胞接种在合适的培养基中，即对照组使用含有2%葡萄糖的培养基，热量限制细胞使用含0.1%或0.5%葡萄糖的培养基，30℃摇晃过夜以完成预孵育。第二天再次将细胞接种在新鲜培养基中，起始时OD_{600}为0.15～0.20，待其生长至对数期并达到0.8～1.0的OD_{600}值。

(2) 用1×PBS连续稀释细胞直到终浓度达到每毫升3×10^3～4×10^3个细胞。吸取500 μL稀释后的细胞加在含有2%葡萄糖，未添加腺嘌呤的YPD大平板上（**注释16**），轻轻摇晃同时使用无菌玻璃珠将其铺展均匀。

(3) 平板风干后，30℃孵育直到菌落肉眼可见并可以不费力地用肉眼计数。这通常需要在30℃下生长2天。将平板转移到4℃至少2～3天，或直到红色在经历标志物损失之后变得明显（**注释17和18**）。

(4) 肉眼计数每个平板上的半扇形菌落（**图9.2C**）。每个平板上的总菌落数排除全红的菌落。半扇形的菌落表示在第一次细胞分裂时发生了标志物损失。野生型W303AR品系在含有2%葡萄糖的培养基中生长时，重组频率约为1×10^{-3}，而删除*SIR2*可以将重组频率提高约10倍，达到约1×10^{-2}。

9.4 注释

(1) 因为该过程需10～14天来完成，必须保证琼脂平板不过度脱水。平板在培养箱或冷藏室中保存时应始终用保鲜膜或Para Film仔细包好。考虑到琼脂会发生脱水和收缩，平板中应加入比平常更多的琼脂。琼脂水平通常距培养皿顶端2/3～3/4。

(2) 应至少在使用前一天铺制平板，使得多余的水分有足够的时间蒸发掉，否则琼脂很难剥离。

(3) 对于寿命检测实验，最好不要将2×YEP培养基高压灭菌，而是使用0.22 μm过滤器过滤灭菌后使用。可以根据品系特定的营养缺陷型，向培养基中补充其他氨基酸。

(4) 使用从保鲜膜中取出的培养皿，盖上盖子，放在实验台上过夜，使板上潜在的挥发性的增塑剂蒸发。

(5) 最好用针在琼脂表面拖拽细胞，而不是直接将其从表面挑取。这样可以保证细胞始终与培养基接触。

(6) 因为平板在这段长时间内需要不断打开并盖上，避免污染非常重要。如果板上生长的一个小的真菌或细菌距酵母很远，可以通过用无菌手术刀切除掉污染的部分来清

除污染。另一个麻烦的污染来源可能是果蝇，它们会抓住所有机会在平板上走来走去，导致实验失败。

(7) 平板需轻拿轻放，因为突然的颤动会造成细胞脱落。

(8) 尽量每天剥离细胞。平板在冷藏室里放置一整天是可以接受的，但应避免放置更长的时间，如一整个周末的情况。每天分析操作的次数取决于细胞的分裂速率。

(9) 初学者每次分析样品应不超过两列，即一个实验组和一个控制组。之后随着技术水平的提高和速度的加快，可以尝试 3～9 列细胞。同时不建议在一个平板上接种超过 3 列细胞，这会增加养分的消耗并使平板脱水更快，因为每个平板都会在剥离操作过程中打开更长的时间。

(10) 一天之内进行的剥离操作越多，尤其是在第一周，所得的结果会越好，即整体寿命更长。

(11) 衰老的母细胞特别脆弱，因此，去除顽固的子细胞时不应当用解剖针尖猛击母细胞。这时母细胞很容易在压力之下破掉。

(12) 显然，母细胞不应过度分裂生长，因为之后它会变得几乎无法辨认，但同时它们也不应该被剥离得过于频繁，这往往会缩短其寿命，可能是由于机械损伤。对于 W303AR 细胞，每 2 次剥离之间经历 2～3 次分裂的频率是适当的。

(13) 如果琼脂最终收缩到一个点，解剖针将难以达到表面去剥离细胞。这种情况下，可以用热手术刀仔细剪去部分平板边缘，使操作容易进行。但除非完全必要最好不要这样，因为更大的开口将加速脱水。此外，剪切平板时应将平板向上倾斜，避免细胞接触到熔融塑料释放出的有毒烟雾。

(14) 最初使用的微珠购自 Perceptive Biosystems (Framingham, MA)，这家公司已不再经营。因此，为了执行磁性分选，需使用其他来源的微珠代替，微珠的用量需要实验人员根据经验决定。

(15) 酵母细胞壁被消化之后，原生质体在光学显微镜下呈现出“朦胧的”或清晰的轮廓。相反，细胞壁完整的酵母表现出更高的折射率。

(16) 无论液体培养的初始葡萄糖浓度是多少，重组分析中使用的大平板都应含有 2%的葡萄糖，否则不会出现红色。

(17) 菌落出现后将平板在 4℃保存几天也会对实验有帮助。随着时间的推移，红色着色越来越强，更容易检测到半扇形菌落。

(18) 大平板中省略组氨酸将使得红色染色变得更强，因此更容易检测到扇形菌落。

参考文献

1. McCay, C. M., Maynard, L. A., Sperling, G., and Barnes, L. L. (1975) Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories. *Nutr. Rev.* **33**, 241-243.
2. Jiang, J. C., Jaruga, E., Repnevskaya, M. V., and Jazwinski, S. M. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J*. **14**, 2135-2137.
3. Lin, S. J., Defossez, P. A., and Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Science* **289**, 2126-2128.
4. Rogina, B., and Helfand, S. L. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie re-

striction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15, 998-16, 003.

5. Lane, M. A., Mattison, J., Ingram, D. K., and Roth, G. S. (2002) Caloric restriction and aging in primates: relevance to humans and possible CR mimetics. *Micros. Res. Tech.* **59**, 335-338.
6. Petes, T. D. (1980) Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell* **19**, 765-774.
7. Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* **91**, 1033-1042.
8. Defossez, P. A., Prusty, R., Kaeberlein, M., et al. (1999) Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol. Cell* **3**, 447-455.
9. Bitterman, K. J., Medvedik, O., and Sinclair, D. A. (2003) Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Micro. Mol. Biol. Rev.* **67**, 376-399.
10. Fabrizio, P. and Longo, V. D. (2003) The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae. *Aging Cell* **2**, 73-81.
11. Barton, A. A. (1950) Some aspects of cell division in saccharomyces cerevisiae. *J. Gen. Microbiol.* **4**, 84-86.
12. Sinclair, D. A. and Guarente, L. (1997) Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell* **91** (**7**), 1033-1042.
13. Petes, T. D. (1980) Unequal meiotic recombination within tandem arrays of yeast ribosomal DNA genes. *Cell* **19**, 765-774.
14. Falcon, A. A. and Aris, J. P. (2003) Plasmid accumulation reduces life span in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **278** (**43**), 41, 607-41, 617.
15. Lamming, D. W., Latorre-Esteves, M., Medvedik, O., et al. (2005) HST2 mediates SIR2-independent life-span extension by calorie restriction. *Science* **309**, 1861-1864.

第10章　使用果蝇进行营养基因组学和寿命研究的方法：高蔗糖/棕榈酸/大豆/牛肉饮食的作用

Methods for Nutrigenomics and Longevity Studies in Drosophila Effects of Diets High in Sucrose, Palmitic Acid, Soy, or Beef

Jiatao Ye，Xiangqin Cui，Ann Loraine，Kerry Bynum，Nam Chul Kim，Gregory White，Maria De Luca，Mark D. Garfinkel，Xiangyi Lu，Douglas M. Ruden

摘要　营养基因组学旨在研究基因与营养之间相互作用以及它们对机体健康和新陈代谢的影响。将营养基因组学与寿命结合在一起研究是顺理成章的拓展，并有希望帮助鉴定出营养影响衰老过程和寿命的机制，若结合年龄相关的功能检测，就可以确定健康寿命。本章讨论遗传学技术、饮食操纵、代谢研究以及微阵列分析方法研究营养如何影响果蝇的基因表达、寿命、三酰甘油水平、总蛋白水平以及体重。为了更好地阐释营养基因组学技术，我们分析以对照饮食（高蔗糖）饲喂的果蝇幼虫和成虫，并将其与高饱和脂肪饮食（棕榈酸）或高蛋白饮食（大豆或95%瘦牛肉馅）饲喂的果蝇进行比较。以上研究的大体结果令人惊讶，三酰甘油和总蛋白水平在所有喂食牛肉的成虫组均显著降低，同时总蛋白水平在喂食大豆的雄性果蝇组显著升高。进一步研究发现，所有3种实验组饮食均显著缩短寿命，并且延长了从受精卵到成虫的发育时间，这在意料之中。我们在这里也展示了初步的微阵列分析结果，与喂食蔗糖的对照组果蝇相比，实验组果蝇的18 000个基因中只有2%～3%的基因的mRNA表达水平发生了显著改变。本章也讨论了这些结果以及其他类型的营养基因组学和寿命分析的意义。

关键词　营养基因组学；寿命；老化；微阵列；果蝇；极端饮食

10.1　引言

营养基因组学在全基因组水平对营养状况与基因表达的相互作用进行分析，通过对大量基因组进行测序和注解得以实现。不良的饮食方式是诱发多种疾病的危险因素（*1～5*），因此营养基因组学很重要。可以利用现有的大量全基因组序列，使用全基因组微阵列技术研究饮食与基因的相互作用。微阵列技术已经发展到可以检测出当一个特定的营养成分加入到饮食中时，基因组中每一个基因的mRNA表达情况的改变。另外，营养基因组学手段也可用于鉴定衰老标志物，预测疾病发生以及行为基因组学研究。

黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）适用于很多类型的营养基因组学研究（**参考**

文献 6 综述）。不同于酵母或线虫，果蝇有脂肪细胞构成的脂肪体（*7*），因此与哺乳动物更为类似。果蝇同样具有保守的脂肪代谢途径和相关信号通路，包括胰岛素信号等（*7*～*10*）。另外，果蝇的优势还表现在其复杂的遗传学特点，较小的基因组，繁殖力强，成本低以及世代时间短。超过 50%的果蝇基因可获得突变，缺陷型的构建已揭示了 90%以上的果蝇基因组（www.flybase.org）（*11*）。超过 76%的人类疾病基因在果蝇上是保守的（*12*）。廉价的 DNA 微阵列技术已被开发出来，用于分析在基因型和环境改变时果蝇基因表达的变化（*13*）。同时，越来越多适应不同生态环境的昆虫和其他动物的测序也在进行之中，使比较基因组学和"适应性"营养基因组学的前景更明朗。未来面临的挑战是将营养基因组学手段应用在果蝇以及其他模式生物上，以获取人类的基因与营养相互作用的线索（*14*）。

毫无疑问，用实验数据来说明如何对果蝇进行营养基因组学研究，会使信息更充实。因此，本章我们将结合初步数据介绍 3 种饮食对果蝇成虫的基因表达和寿命的影响（*15*）。我们本章研究的 3 种饮食方式是：①高棕榈酸饮食（高饱和脂肪饮食）。②高大豆饮食（亚洲饮食）。③高牛肉饮食（阿特金斯类饮食）。接下来分别对这 3 种饮食类型在果蝇、人类和其他模式生物的之前的研究进行讨论。

10.1.1　高脂饮食缩短果蝇寿命

CR（热量限制），或更确切地说，饮食限制，可延长果蝇和许多其他动物包括人类的寿命（*16*～*23*），但这并非本章的重点。与此相反，饮食中饱和脂肪在与其他类型营养物质等热量（相同的热量）的情况下已被证实会减少果蝇的平均寿命和最长寿命（*24*～*26*），但饱和脂肪产生有害影响的具体机制尚不清楚。最初试图将果蝇的饮食构成与寿命联系在一起的研究发现，等热量高饱和脂肪（如棕榈酸）低碳水化合物饮食与高碳水化合物低饱和脂肪饮食的对照组相比，平均寿命会缩短（*24*～*26*）。由 Driver 和他的同事在 20 世纪 70 年代末 80 年代初进行的这些早期研究（*24*～*26*）并没能明确指出脂肪摄入对代谢过程产生负面影响的具体机制，但是他们的工作为进一步研究奠定了基础。

然而遗憾的是，其他研究人员并没有跟随这些由 Driver 和他的同事进行的早期研究（*24*～*26*）。除了饮食限制，很少有最新的针对饮食对果蝇寿命影响的研究。同样，除了饮食限制（*27*），也很少有针对饮食对果蝇幼虫发育的影响的工作。随着最近 20 年出现的基因组测序、微阵列、突变系等先进技术的发展，我们能够更好地进行详细的营养基因组学研究，并理解饮食中脂肪对健康和寿命的全面影响。

10.1.2　大豆对健康的益处

科学家们开始理解饮食中大豆对健康的潜在益处。1999 年，美国食品药品监督管理局（FDA）建议"每天 25 g 大豆作为低饱和脂肪低胆固醇饮食的一部分，可降低患心脏病的风险"（*28*）。市售的豆制品，如豆腐和豆浆，由蛋白质、脂肪和碳水化合物

提供的能量的比例一般为 37%、37%、26%（%kcal①）。大豆蛋白提供了所有必需氨基酸，其质量等同于肉类和牛奶蛋白。肉类和大豆相结合的食物有助于学校提供满足美国膳食指南的食物，并提高学校膳食的营养价值（***29***）。大豆脂肪酸组成包括 61%的多不饱和脂肪酸，约 24%的单不饱和脂肪酸，而只有约 15%的饱和脂肪。大豆油是为数不多的良好 ω-3 脂肪酸，如 α-亚麻酸的来源之一。研究证实，它们可以降低一些慢性病的风险，如关节炎、癌症及冠状动脉疾病（**参考文献 30～34** 综述）。

除了蛋白质、脂肪和碳水化合物，大豆也含有大量（生物意义上来讲）的皂苷，异黄酮（黄酮类）和其他植物化学物质（***35***）。这些物质已被证实与降低血清胆固醇和血脂水平有关联（***36***，***37***）。Lucas 和他的同事报告说，用乙醇提取的大豆蛋白（除去了皂苷、异黄酮、类黄酮和其他植物化学物质）喂养叙利亚黄金地鼠，则没有降低胆固醇的作用（***38***）。大豆降低胆固醇水平与肥胖的作用很可能是其中若干组分的协同作用或叠加，而不是某一种成分的单独作用。皂苷是一种两性分子，能产生肥皂样的泡沫。皂苷是一类结构各异的三萜或甾类糖苷，能够降低模式生物的胆固醇水平（***39～43***）。一些皂苷会与胆固醇形成不溶性复合物，而当这个过程发生在肠道中时，就能够抑制肠道对内源性和外源性胆固醇的吸收（***39***）。

大豆异黄酮（如大豆苷元和染料木黄酮等）对血脂和血清胆固醇水平的影响还不是很清楚。Wagner 和同事对猴子进行的研究表明，含大豆异黄酮的大豆蛋白（而不是富含异黄酮的补充剂）会提高动脉低密度脂蛋白代谢并改善动脉粥样硬化（***44***，***45***）。Yousef 和同事用雄兔分析了纯化的异黄酮对精浆（射精）生化指标的影响（***46***）。他们发现“总胆固醇、胆固醇占总脂类的百分比、高低密度脂蛋白显著增加（$p < 0.05$），而实验动物组的精浆中的三酰甘油水平未出现变化”（***46***）。他们还分析了纯化的异黄酮对家兔血清生化指标产生的影响（***47***）。作者报道，“结果表明，与对照组相比，2.5 mg/kg体重和 5 mg/kg 体重的异黄酮剂量组分别使血浆总脂（TL）降低 16%和 19%（$p < 0.05$），总胆固醇降低 20%和 20%，三酰甘油（TG）降低 18%和 23%，低密度脂蛋白（LDL）降低 19%和 22%，极低密度脂蛋白（VLDL）降低 18%和 23%，低密度脂蛋白：高密度脂蛋白的比例降低 36%和 39%，而高密度脂蛋白（HDL）水平分别增加了 29%和 32%”（***47***）。

流行病学资料显示，富含大豆的膳食可以降低男性前列腺癌的发病率（***48***，***49***）。前列腺癌是西方国家最常被确诊的癌症之一，死亡率接近 10%（***50～52***）。Boyle 和同事提出，前列腺癌的发病率在未来的 30 年翻倍（***53***）。然而，美国男性中前列腺癌的发病率比日本大阪男性高 30 倍，比中国上海男性高出 120 倍（***54***）。与其说原因在于高脂肪摄入这个“饮食罪恶的根源”和潜在的致癌因素，也有可能像 Griffiths 在一篇关于大豆与癌症的综述中提到的，“血浆中高水平的植物雌激素被认为对前列腺癌具有预防作用，而且雌激素与前列腺生理情况的关联比迄今为止人们想象中的要高”（***54***）。

与男性的前列腺癌一样，流行病学数据显示，富含大豆的饮食能降低女性乳腺癌的发病率（***48***，***49***）。乳腺癌风险的降低已被证实与终生摄入含雌激素化合物的植物性食

① 1 kcal=4184 J，后同。

物有密切联系，特别是大豆异黄酮（***55***）。在上海进行的乳腺癌研究中收集的数据表明，亚洲国家含大豆异黄酮的饮食对乳腺癌具有预防作用（***55***）。这些研究使大豆降低癌症发生风险的研究得到了关注。更多针对大豆饮食如何影响癌症发生和发展的研究是非常必要的。

10.1.3 有争议的低碳水化合物高牛肉饮食的健康效益

最近，西方国家肥胖的流行促进了低碳水化合物饮食的普及，如 Atkins®（***56***），South Beach®（***57***），Protein Power®饮食（***58***）。这种迅速转变的饮食习惯尽管遭到大多数营养机构的反对，但已对食品行业产生了深远影响（***29***）。最近，一些营养专家称理解低碳水化合物饮食在一些研究中成功的原因是非常必要的（***59***），但很少有这方面的工作开展。Feinman 和 Fine 认为，低碳水化合物饮食有“代谢优势”，因为蛋白质需要代谢能量将其转换为碳水化合物（***60***）。

衡量食物代谢效率是否低下的一个重要概念是“产热”（食物的热效应），或者说是代谢食物产生的热量。正如 Jequier 最近发表的综述中总结的那样（***61***），各种营养物质的热效应分别为脂肪 2%～3%、碳水化合物 6%～8%、蛋白质 25%～30%。Feinman 和 Fine 利用这些值来计算各种饮食的“有效收益”——对于每天 2000 kcal 的膳食，能量分配如果遵循推荐的营养组成，即碳水化合物∶脂肪∶蛋白质＝55∶30∶15，则会有 1848 kcal 的“有效收益”（***60***）。然而，当碳水化合物产热降低到膳食总热量的 8%时，即 Atkins（***56***）、South Beach（***57***）和 Protein Power 饮食（***58***）早期阶段的建议，每摄入 2000 kcal 将有额外 140 kcal 以产热的方式散失（***60***）。最近，这些“流行减肥方法”已经不再流行，特别是最近的研究表明，“超重”人群（身体质量指数 BMI 为 25～30）与“正常体重”的人群相比死亡率并没有显著升高（***62***）。

10.1.4 对牛肉膳食的营养基因组学研究

很多低碳水化合物饮食，如 Atkins 饮食，主要组成部分是 95%瘦牛肉，以“没有面包的汉堡包”为代表（***56***）。瘦牛肉馅含 35%的脂肪和 65%的蛋白质（%kcal），一份 85 g 的瘦牛肉馅约含 65 mg 胆固醇和 55 mg 钠。脂肪部分由大约等量的饱和脂肪酸和单不饱和脂肪组成（美国 FDA 食品标签）。出乎意料的是，我们只能找到一例用牛肉饮食饲喂果蝇（***63***），以及一例用牛脂饲喂小鼠的微阵列研究（***64***）。牛肉饲喂果蝇的论文发表在 1979 年，标题是《照射灭菌牛肉和火腿未能促使果蝇基因变异》（***63***）。该文的目的是减轻人们对辐照食物的不合理恐惧，而遗憾的是，民众仍普遍认为“辐照食物是人类的致癌物质”。除了前面提到的小鼠微阵列论文（***64***），其他几个实验室也通过喂食纯牛肉脂肪（牛脂）来诱导肥胖（***65***，***66***）。然而，在人类饮食中很少有大量消耗纯牛脂的情况，因此用这些结果推测其对人类的影响会存在问题。

在本章所描述的实验中，我们饲喂果蝇的饮食含有 95%瘦牛肉馅，以确定摄入牛肉为主的饮食对代谢的影响。令人惊讶的是，就我们所知，95%瘦牛肉饮食尚未用在动物模型上进行营养基因组学研究。如下文中所述，我们的发现表明，添加 95%瘦牛肉、富含大豆或棕榈酸的饮食均可延长果蝇幼虫期，但会缩短最大寿命和平均寿命。然而，

只有牛肉饮食能显著降低果蝇成虫的三酰甘油水平。在最后一节，我们将讨论这些研究结果对人类健康和寿命的启示。

10.2　材料

10.2.1　使用同基因型品系果蝇的重要性

利用只有一个基因或一个基因组区域存在差异的同基因型品系的果蝇很重要，因为不同的遗传背景对寿命、代谢和基因表达模式的影响可能比环境因素更大（***68***）。从印第安纳州的Bloomington的果蝇库存中心以及分布在世界各地的而且规模较小的中心（www.flybase.bio.indiana.edu）可以获得数千个果蝇品系。最近，Exelixis公司推出了最为有用（至少在营养基因组学研究中）的PBac转座子插入和同基因缺陷型果蝇（***11***，***67***）。这些品系都源于Bloomington库存中心的一个高度特征化的同基因品系*iso*-w^{1118}、*iso*-2和*iso*-3。Exelixis公司收集了包括超过29 000个PBac转座子插入株，标定了超过7200个不同的基因。Exelixis公司的同基因缺陷库，再加上美国印第安纳大学的Kevin Cook和同事得到的果蝇株，还包括519个缺陷，涵盖了约56%的果蝇基因组（***11***，***67***）。由于这些缺陷通常覆盖基因组上很小的区域（10万～30万个碱基对），因此不太可能同时缺失同一通路上的多个基因，这也正是生成缺陷型时普遍需要考虑的一个问题。

10.2.2　饮食条件

正常饲养条件下，我们使用标准的玉米粉-琼脂-糖果蝇饲料（***15***）。特殊的食物，如棕榈酸、大豆和含牛肉的配方，我们按照Driver和同事的方案（***24***）。Driver和同事（***24***）的食物配方含有玉米粉、琼脂、燕麦粉、蔗糖或等热量的棕榈酸、豆腐或牛肉（见10.2.4节，缓冲液和食物的制备）。大多数老化研究实验室使用蔗糖-酵母饲料（没有玉米粉或燕麦粉）为更好地控制营养含量。

还要注意饮食中需有相同水平的磷酸盐、蛋白质、脂类、血糖指数等，这些指标会由于成分来源不同而变化。我们尚未进行控制这些指标的果蝇实验，但根据提出的营养问题，它们也是重要的考虑因素。例如，在哺乳动物模型中，低磷酸盐饮食刺激小肠中无机磷（Pi）的跨上皮运输，这与Na-Pi共转运子在顶端的定位变化相关联（***69***）。低Pi的饮食也会导致在哺乳动物小肠中维生素D3的吸收水平升高（***69***）。

无论蛋白质或脂类的来源是肉类还是豆制品，都可以潜在地影响新陈代谢，考虑到各方面因素，需要用等量蛋白质或等量脂质饮食。例如，根据Ascencio等的研究（***70***），“摄入大豆蛋白可以降低人类和其他动物的血脂，而且大豆蛋白的消化能够将胰岛素维持在正常水平”（***70***）。脂类也分为“好的”（如多不饱和脂肪酸）或“坏的”（如饱和脂肪酸），所以等量脂质饮食是第三个需要考虑的方面。例如，Tatematsu等（2005）研究表明“菜籽油（can）和其他一些油，与大豆油（soy）相比，缩短SHRSP大鼠的寿命”（***71***）。确定特定的蛋白质或脂类在果蝇中是否也有类似的效果是很有价值的研究。

最后，取决于特定的营养基因组学研究目标，需要考虑有关食物成分的其他因素。可能要考虑血糖指数（GI）又称血糖负荷（GL），这与营养物质的消化和吸收速度相关，它描述饮食中的总 GI。简单的糖 GI 很高，而复杂的碳水化合物的 GI 较低。根据 Colombani 的一篇就 GI 对人体营养的重要性的综述，“有观点认为，低 GI 和低 GL 饮食对许多在发达国家流行的慢性非传染性疾病有好处，包括Ⅱ型糖尿病、胰岛素抵抗、肥胖、心血管疾病（CVD）和癌症”（**72**）。虽然尚未进行研究，但据我们所知，GI 很可能在调控果蝇代谢过程，如疾病抵抗或胰岛素信号转导中扮演重要角色。

10.2.3　生长条件

1. 气候条件

在果蝇和其他无脊椎动物中，寿命与温度成反比（**参考文献 73** 综述）。因此，在恒定的气候条件下进行相对寿命实验很重要。就本章中的实验而言，果蝇在 25℃，60%～80%的湿度下饲养在保温箱（Percival，Inc.）中。为了控制昼夜节律变化，采用 12 h 光照、12 h 黑暗的周期，微阵列和代谢检测使用每天同一时间（6 h 光照后）取出的果蝇。

2. 幼虫密度

培养密度对幼虫身体大小和脂肪含量有很大影响。因此，在本章所述实验的培养条件中都对幼虫密度进行了控制。为控制培养密度，取出不超过 50 只幼虫或虫卵，并置于含有约 10 mL 食物的新瓶中。在第 10～16 天随机采集小瓶中未交配的雄性和雌性果蝇。对大瓶而言，每瓶含约 50 mL 食物，装入 200～300 只幼虫或虫卵。大瓶和小瓶中均放有折叠的滤纸或若干张小的无菌的 KimWipes®（Fisher，Inc.），使得三龄幼虫有足够的爬行和化蛹空间。

3. 成虫培养条件

在交配过的果蝇成虫的寿命实验中，每笼中放入未交配的雌雄果蝇各不超过 50 只。每个笼子里有一个加入了 10 mL 食物的 9 cm 培养皿（Fisher，Inc.），上面扣一个 100 mL塑料烧杯（Fisher）。装有食物的培养皿在室温下盖着盖子干燥过夜，因为成虫可能粘在潮湿的食物上。在塑料烧杯上戳几十个针孔（将 20 号针头在煤气喷灯上加热后穿刺塑料），使空气流动。每两天将成虫转移到装有新鲜食物的新的笼子中，对死亡的雄性和雌性果蝇分别计数。

我们确保简易笼子的孔足够小，使得成虫无法爬进爬出，而且我们从未观察到在笼子里的果蝇受到其他品系的污染；尽管如此，当需要使用笼子而非小瓶或瓶子的情况下，大多数实验室使用 Curtsinger、Tatar 和 Promislow 实验室设计的“队列笼”（***74～76***）。与我们使用的烧杯和培养皿系统相比，使用“队列笼”在更换食物以及除去动物尸体时简单得多。

10.2.4　缓冲液和食物的制备

1. 均质化缓冲液

此缓冲液（0.01 mol/L KH_2PO_4，1 mmol/L EDTA，pH 7.4）用来测定三酰甘油。在此缓冲液中磨碎冷冻在液氮中的果蝇。

2. 食物的制备

（1）向10加仑电蒸汽水壶（Legion Industries，Inc.；model TEH-10）中加入5.4 L水，煮沸。

（2）加入玉米粉500 g、燕麦粉250 g，干酵母50 g、琼脂30 g，并混合均匀。

（3）煮20 min。

（4）等量分装在4个大塑料烧杯中，分别标记为a、b、c和d。

（5）向烧杯a中加入166.7 g蔗糖，烧杯b中加入66.7 g棕榈酸，烧杯c中加入366 g Mori-Nu Silken Tofu（特别结实的豆腐），烧杯d中加入114 g瘦牛肉馅（95%）（预先煮熟，干燥，并制成颗粒）。

（6）用木棒将糖混合在溶液中。当烧杯降温至60℃时，向每个烧杯中加入：溶于36 mL 95%乙醇的5 g甲基4-羟基苯甲酸，溶于32.4 mL水的1.3 g链霉素，15.2 mL丙酸。

（7）将烧杯a～d中的溶液分装到小培养皿中，并向1.5 L的小瓶中加入载体。

（8）由于不同种类的食物彼此相似，小瓶、大瓶、培养皿都需仔细做上标记，以容易记住的标记条纹系统来区分每个类型。

10.3　方法

10.3.1　产生同基因果蝇

如前所述，在营养基因组学研究中使用同基因果蝇品系很重要。Exelixis PBac插入或缺陷型可以直接使用，因为它们已经是同基因型品系 w^{1118}，*iso-2*；*iso-3*。然而，如果在另一个遗传背景下，您最感兴趣的基因（your favorite gene，*yfg*）上已经存在突变（yfg^-），则应当将这个突变株与同基因果蝇回交若干代（通常为10～20代），然后将突变株与相同基因背景下的染色体平衡。幸运的是，w^{1118}，*iso-2*；*iso-3* 等基因平衡品系都可以从Indiana果蝇库存中心（www.flybase.indiana.edu）订购。

在雌性种系中筛选若干代 yfg^- 突变，以得到同基因果蝇品系（因为同源染色体重组只发生在雌性果蝇中）。去年，我们在本系列书中讨论了这些技术（**77**），但Exelixis推出的同基因PBac插入株，正如前面所讨论的，极大地简化了同基因化的步骤。现在，为了在同基因背景下得到一个在感兴趣的基因上的突变（yfg^-），只需将这个品系与最接近的PBac转座子插入株回交，隐性致死则更好。由于有大量PBac插入突变，Pbac即使不在感兴趣的基因之中，很可能与这个基因距离很近，重组率小于1 cM

(1%的重组率)。PBac 插入可以用微型 w^+ 转基因方便地标记，因此可以在 yfg^-/Pbac（w^+）未交配过的雌性果蝇与 PBac（w^+）/Balancer（*Bal*）雄性果蝇之间回交的每一代中选择 PBac（w^+）/ yfg^- 果蝇。需要注意的是，如果 PBac 插入是隐性致死突变，则不会出现 PBac（w^+）/ PBac（w^+）果蝇；而如果 *yfg* 是必需基因，则不会出现 yfg^-/ yfg^- 果蝇。如果 PBac 插入不是隐性致死，仍然可以使用这种方法，但必须能够区分 PBac（w^+）/PBac（w^+）果蝇与 PBac（w^+）/ yfg^- 果蝇，这通常可以很容易地根据眼睛中色素的多少分辨。如果 *yfg* 不是必需基因，人们也可以应用上述的原理和方法筛这个染色体。

10.3.2 三酰甘油、总蛋白质与活体重的确定

随机从小瓶和大瓶中采集未交配的雌雄果蝇，按之前“材料”部分中所述准备以控制密度。实验中每行每种性别分别做 6 个重复，每组含 10 只。采集之后 24 h，将果蝇称重，并均质化。均质化的步骤与 Clark 和 Keith 所使用的相同（***68***）。简单地说，果蝇成虫的均质化在冰上进行，置于 25 μL 均质化缓冲液中（上文讨论过）。在微量离心机中 2000 r/min 离心匀浆 2 min。表层的脂质在上清液中重悬，并将匀浆分装在 0.5 mL管中。按照如下步骤测量每个样品中的活体重、三酰甘油和总蛋白：

（1）用分析天平称量活体重，精确度为 0.1 mg。

（2）使用分光光度计测量三酰甘油。使用 *Vitros* DT60 Ⅱ 读卡器（Johnson and Johnson Clinical Diagnostics，Inc.）和 *Vitros* TRIG DT®幻灯片。*Vitros* TRIG DT®幻灯片是在塑料支柱上的干燥的多层膜。它包含了确定匀浆中三酰甘油水平的全部必要的试剂。将 10 μL 匀浆滴在幻灯片上。样品均匀散开，并扩散进入薄膜层。样品中的三酰甘油在幻灯片中经历一系列的反应，产生有颜色的复合物。颜色的强度与样品中三酰甘油含量成正比。

（3）总蛋白的测定使用改良的 Lowry 蛋白检测试剂盒（PIERCE Biotechnology）。将 200 μL 匀浆等份加入 1 mL Modified Lowry 试剂中。室温孵育 10 min 后，加入 100 μL制备好的 1×Folin-Ciocalteu 试剂。室温孵育 30 min 后测量 A_{750}。通过蛋白质标准曲线计算蛋白质含量。

10.3.3 三酰甘油、总蛋白与活体重的统计分析

3 种检测都使用协方差分析（ANCOVA）检测由于食物来源和性别导致的遗传表型变异，协变量为体重和总蛋白。**表 10.1** 归纳了饲喂 10 天的对照组、棕榈酸、大豆和牛肉饮食的果蝇的结果。本章中分析的 7 种饮食条件如**图 10.1** 所示。这些代谢实验中，显著性的结果（$p < 0.05$）为雌性果蝇和雌雄混合果蝇的三酰甘油在 10 天的牛肉饮食后显著降低（*p* 值分别为 0.0233 和 0.0075）。此外，大豆饲喂 10 天的雄性果蝇的总蛋白质显著增加近两倍（$p = 0.0132$），而且比牛肉饲喂 10 天的雌雄混合果蝇高出 50%以上($p=0.001$)。其他条件都没有对三酰甘油或总蛋白水平产生显著影响，3 种饮食对活体重都没有显著影响。无影响的结果也很重要的，因为它表明饮食并非简单地影响果蝇的体重。

表 10.1 4种饮食饲喂的果蝇的三酰甘油、蛋白质和活体重数据

	对照组三酰甘油/（μg/只）	棕榈酸组三酰甘油/（μg/只）	大豆组三酰甘油/（μg/只）	牛肉组三酰甘油/（μg/只）	对照组蛋白质/（μg/只）	棕榈酸组蛋白质/（μg/只）	大豆组蛋白质/（μg/只）	牛肉组蛋白质/（μg/只）	对照组活体重/（mg/只）	棕榈酸组活体重/（mg/只）	大豆组活体重/（mg/只）	牛肉组活体重/（mg/只）
雄性	6.26 (0.21)	NS	5.25 (0.14)	NS	16.4 (3.8)	NS	32.65 (2.49) $p=0.0132$	NS	0.70 (0.02)	NS	0.64 (0.01)	NS
雌性	7.01 (0.14)	NS	NS	5.33 (0.23) $p=0.0233$	40.57 (3.27)	NS	NS	62.21 (5.52)	1.09 (0.02)	NS	NS	0.93 (0.03)
混合	16.74 (0.14)	NS	NS	5.29 (0.19) $p=0.0075$	31.11 (1.55)	NS	NS	49.20 (2.46) $p=0.001$	0.89 (0.01)	NS	NS	0.78 (0.02)

注：p 值使用协方差的混合模型分析来计算（协变量：三酰甘油为活体重和总蛋白；蛋白质为活体重和总三酰甘油；活体重为总蛋白和三酰甘油）。表中给出的数字为平均值，括号中的为标准偏差。NS：与对照组相比无显著性差异。

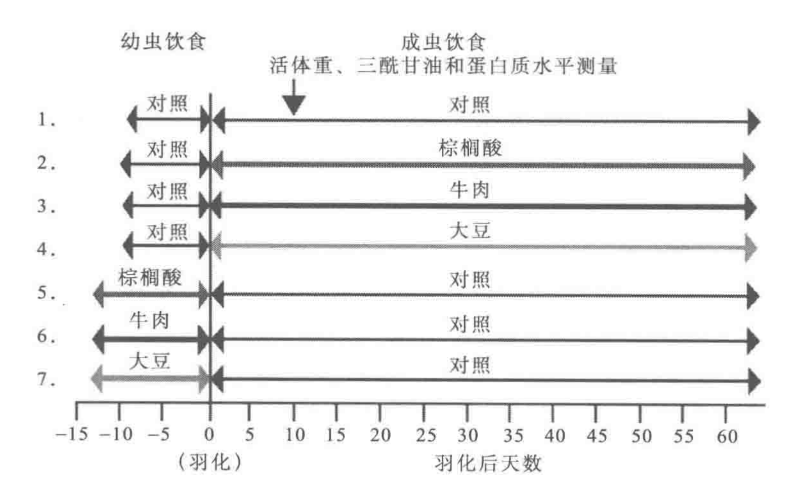


图 10.1 本章中所使用的7个饮食条件。上面的4个条件中，用对照组饮食（高蔗糖）饲喂幼虫，成虫饮食条件分为控制组、棕榈酸组、牛肉组和大豆饮食组，进行寿命实验。微阵列实验中，在羽化后第10天（如箭头所指）处死果蝇，进行活体重（LW）、三酰甘油（TG）和蛋白质水平的测量。在第5～7个条件中，将卵置于指定的食物上，并使用相同的食物饲喂幼虫（棕榈酸、牛肉或大豆食物）。需要注意的是，实验组果蝇从虫卵到羽化的时间长于对照组（**图 10.2**）

10.3.4 测量从产卵到羽化成虫的时间

在成虫寿命研究中，每两天将果蝇成虫转移到装有新鲜食物的新笼子中，并对死亡的雌雄果蝇进行计数。将旧笼中带有虫卵的食物切成小块，每块含有不超过 50 个卵，并置于空的 25 mL 瓶中，以确定亲本的繁殖力并测定后代从虫卵到成虫的时间。此外，每 2 天至少 2 次从这些瓶中采集 1 次未交配的雌雄果蝇，放入单独的小瓶中，用对照组食物饲喂（每瓶不超过 20 只雌性或雄性果蝇），以确定这些果蝇的寿命。我们发现，幼虫时期的一些饮食条件影响果蝇的寿命。然而，这些实验都超出了本章的范围，将在稍后描述。

对照饮食组从虫卵到羽化的时间最短（14.5±1.5 天）（**图 10.2A**），棕榈酸饮食组

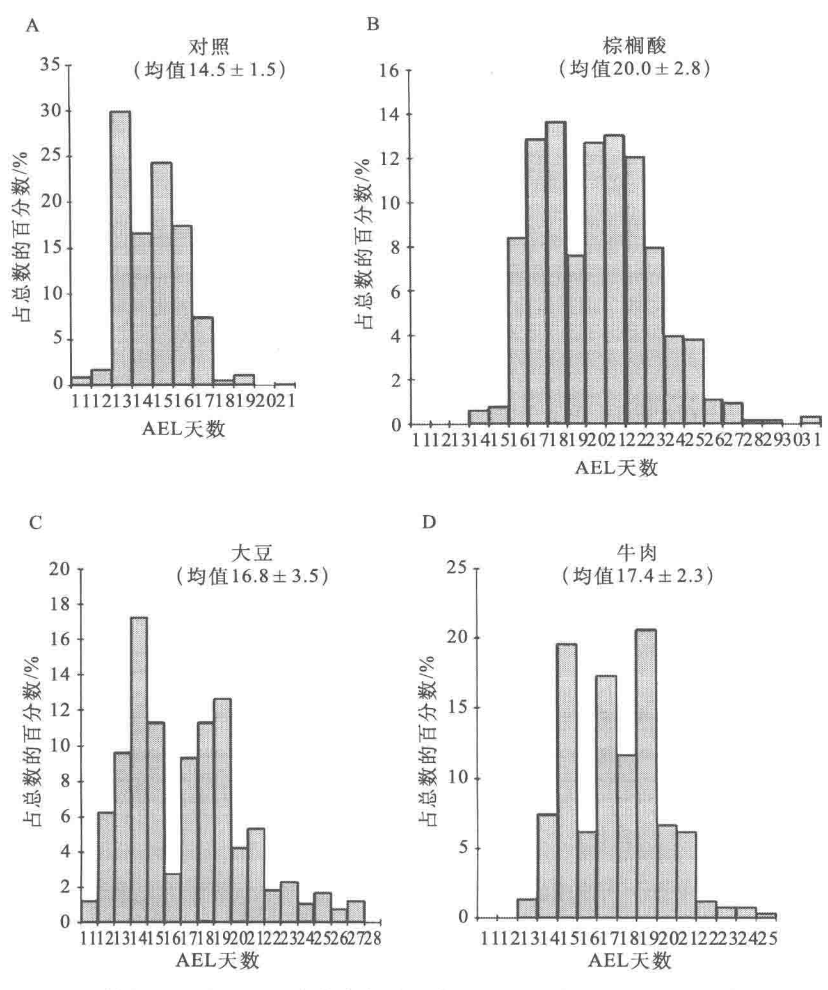


图 10.2 棕榈酸、大豆和牛肉饮食使幼虫期延长。亲本置于含有相应食物的笼内 2 天之后，从 9 cm 培养皿中采集虫卵，转移至小瓶中，每瓶不多于 50 个虫卵。将小瓶置于 25℃培养箱中，产卵后（after egg laying，AEL）第 11～31 天采集未交配的雌雄果蝇。每天至少对破蛹的果蝇总数计数 2 次。从第 11 天起，每天采集的果蝇数量占总数的百分数由柱的高度表示。每种饮食中使用的果蝇数量大于 500

的时间最长（20.0 ±2.8 天）（**图 10.2B**）。大豆和牛肉饮食造成了中等程度的发育延迟（分别是 16.8±3.5 天和 17.4 ±2.3 天）（**图 10.2C** 和**图 10.2D**）。

10.3.5 交配的雌雄果蝇的寿命研究

同基因背景（w^{1118}，*iso-2*；*iso-3*）的 100 只新采集的未交配果蝇（雌雄果蝇各不超过 50 只）在幼虫阶段使用对照饮食饲喂，并转移至放有食物平板的大瓶中。每隔一天，将果蝇转移到装有新鲜食品的平板上，并对死亡的雌雄果蝇计数。实验继续，直到果蝇全部死亡。通过 SPSS 计算进行 Logrank 和 Wilcoxon 检验以分析存活率（***78***）。

5 种饮食各使用 3～5 瓶约 100 只的果蝇。为了做到这一点，提前一星期设置 5 瓶含有 50 mL 对照组食物及约 100 只亲本果蝇的大瓶。每两天换新瓶，因此幼虫年龄基本一致。设置这组瓶子后，我们每天可以采集 100～300 只未交配的雌雄果蝇用于寿命实验。

请注意，这是一个“不断运转”的实验，因为我们无法在 1 天之内采集实验所需的全部未交配雌雄果蝇。为了跟踪寿命实验笼，我们用活页笔记本中带网格线的纸，或使用 Excel® 电子表格。将第一笼标记“1.1（date 1)”，其中“1.1”表示“第 1 种饮食，第 1 笼”，“date”表示设置该笼的日子。在笔记本的第一页的第一列标上“1.1（date 1)”，第二列标上“1.2（date 2)”，以此类推。从设置第一笼之日起，从上至下每隔一天标记在每一行。笔记本第二页用同样的方式标记，以“2.1（date 2)”开始。我们更倾向于使用活页笔记本，这样必要时可以添加额外的页。此外，在显微镜下使用纸和笔记录比直接将数据输入计算机方便。

实验结果是，与对照组相比，实验组中使用的 3 种饮食都显著减少雌雄果蝇的平均寿命和最长寿命，棕榈酸饮食组的雌性果蝇例外（**图 10.3**）（**表 10.2**）。在我们的实验中，即使是对照组的平均存活时间也大大低于以往的研究（**参考文献 *73***）。这很可能由于为了分析后代，我们将雌雄果蝇饲养在一起并令其交配，而不是像通常实验中分开饲养未交配的雌雄果蝇。众所周知，参与生殖的果蝇寿命因为“繁殖代价”明显下降（**参考文献 *79***）。

表 10.2 用 4 种不同饮食饲喂的果蝇成虫的寿命分析

性别	饮食	平均存活时间/天	Log Rank 检验（vs 对照组）	Gehan-Wilcoxon 检验（vs 对照组）
雌	高蔗糖（对照）	24		
雌	牛肉	18	$p< 0.0001$	$p<0.0001$
雌	棕榈酸	24	$p=0.5629$	0.9297
雌	大豆	18	$p<0.0001$	$p<0.0001$
雄	高蔗糖（对照）	30		
雄	牛肉	20	$p<0.0001$	0.0198
雄	棕榈酸	18	0.0128	0.0046
雄	大豆	22	$p<0.0001$	$p<0.0001$

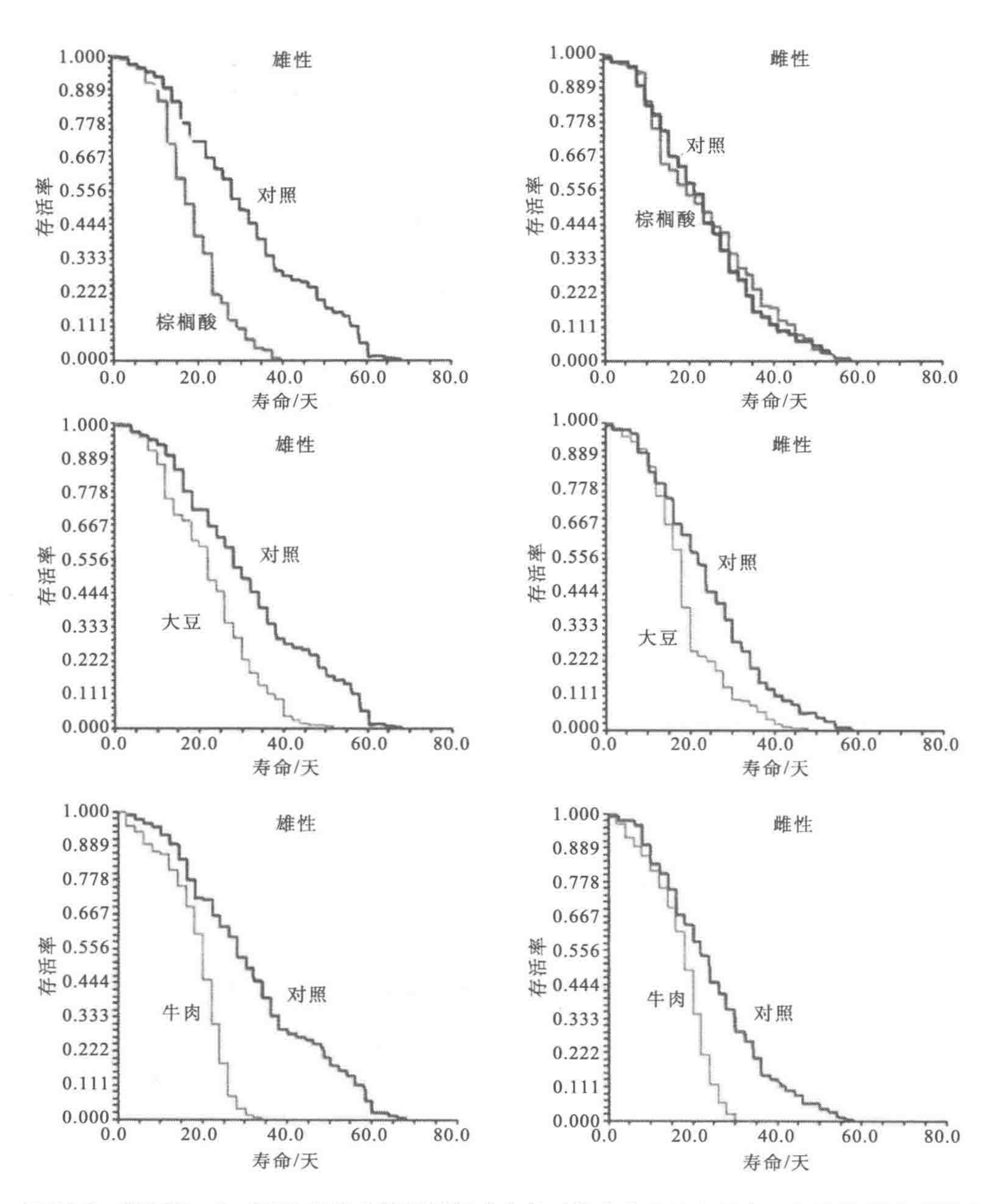


图 10.3　棕榈酸、大豆和牛肉饮食缩短果蝇成虫的平均寿命和最大寿命。红色线表示对照组（高蔗糖饮食）果蝇的生存曲线；绿色线表示指定饮食饲喂的果蝇的生存曲线（见正文）。每种饮食的平均寿命列于**表 10.2**，Log Rank 检测也在**表 10.2** 中列出

虽然人们普遍建议使用长寿品系果蝇进行寿命实验，这未必是必要的。例如，Helfand实验室最近的研究表明，在热量限制和其他延长寿命的条件下，遗传操作产生的极短寿命的果蝇品系的寿命依然可以得到延长（***80***）。因此，尽管出于实际原因，本章的寿命实验不在最佳环境或遗传条件下进行，我们相信，实验结果也能反映其他条件下，在不同饮食下寿命的相对变化。

棕榈酸、大豆和牛肉这3种饮食都能够导致雌性后代生存时间显著减少。使用SPSS程序包中的Kaplan-Meier曲线计算50%存活时间（***106***）。Log Rank检验和Gehan-Wilcox检验表明，与正常饮食相比，棕榈酸、大豆和牛肉饮食都会导致雄性后代寿命统计上有意义的减少。对雌性后代而言，与正常饮食相比，牛肉和大豆的饮食导致寿命统计上有意义的减少，而棕榈酸饮食的雌性寿命没有显著的变化。

10.3.6 微阵列分析

微阵列分析在10天的果蝇成虫上进行，每种饮食的分析使用40～50只果蝇（约50 mg）。每种饮食至少进行4次微阵列分析（雌性和雄性各2次）。然而，为了增加统计功效，本章将雄性和雌性的数据合并。使用TRIZOL®（Invitrogen，Inc）提取总RNA，并使用RNeasy Mini试剂盒®（Qiagen）清洗。使用SuperScript Indirect cDNA Labeling System®（Invitrogen，Inc）产生荧光标记的cDNA。SuperScript系统在SuperScript III RNase H逆转录酶催化的cDNA合成反应中将一个氨基烯丙基（Aminoallyl）修饰的核苷酸和一个氨己基修饰的核苷酸与其他dNTP混合。经过纯化步骤除去未结合的核苷酸，将氨基修饰的cDNA与Cy3或Cy5染料（Amersham Biosciences）偶联。除去未反应的染料，将标记的cDNA与含有约13 000个探针的BDGP近全基因组芯片杂交。使用Genepix Pro®软件扫描、读取微阵列图像，并将其处理成数据文件（参考：http://files.axon.com/downloads/manuals/GenePix_Pro_4.0_User_Guide_Rev_E.pdf）。

10.3.7 微阵列实验的数据处理和统计分析

由于存在多个偏差的来源（**图10.4**），对微阵列的原始数据进行对数变换并归一化，使用“联合局部加权回归分析（joint lowess）”除去每个阵列中的强度和位置偏差（***81***）。从每个数据点减去每个阵列上每个通道的整体平均值，以消除通道之间的整体差异。用简单的方差分析模型（ANOVA）分析归一化的数据，

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + S_j + A_k + \varepsilon_{ijk}$$

其中，μ代表平均基因；D_i（$i=1，2$）代表饮食的影响；S_j（$j=1，2$）代表性别的影响，A_k（$k=1，2，\cdots，$阵列的数量）代表阵列的影响；ε_{ijk}为残差。使用基于收缩的t统计检测饮食的影响（***82***）。由于残差ε_{ijk}的不确定性，使用置换分析建立t统计的零分布，来自500个置换中的t统计量在基因中合并交叉，得到一个为获得p值的平滑分布。因为实验中检测大量的基因，并进行多步骤的调整，将错误发现率（FDR）（***83***）应用于p值。对于所有的饮食，未特别指出时，使用0.1的FDR值选择显著的基因。

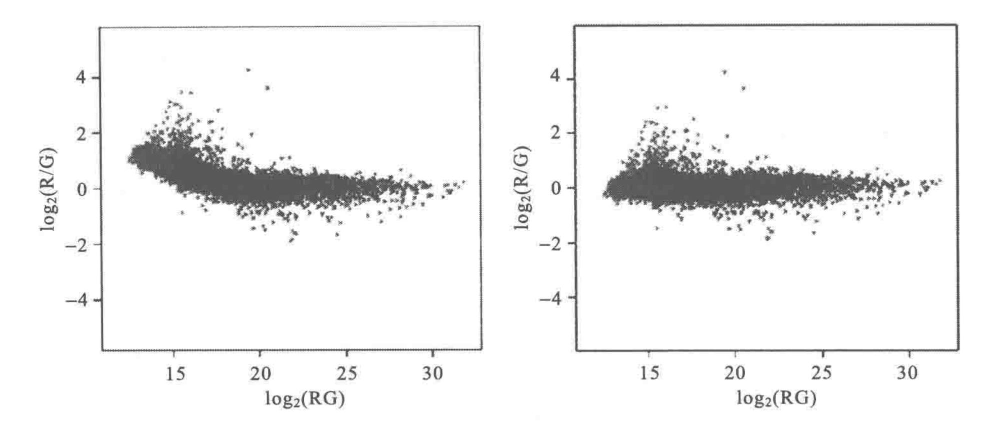


图 10.4 阵列质量诊断。对数比率的 $\log_2$（R/G）与对数强度 $\log_2$（RG）作图。图示在棕榈酸饮食研究中，归一化之前和之后的图（MA 图）微阵列幻灯片。R 为 Cy5® 染料标记点的强度，G 为 Cy3® 染料标记点的强度。红色表示质量较差的数据点。蓝色表示高质量数据点，基于 GenePix 图像处理的结果。左图是归一化前的 MA 图，右图为归一化之后的同一张图（注意在归一化之后，模式变得更直）

10.3.8 差异表达基因的图示

1. 可视化检测结果的火山图

可以使用火山图将染料效果检测的统计检验结果可视化（*84*）（**图 10.5A～C**），该图 x 轴表示了每个基因的倍数变化，y 轴表示统计强度（传统 t 检验的表列 p 值的负对数）。选出有显著性的基因，在上角突出显示（灰点）。水平线表示传统 t 检验 0.001 的象征性的显著性水平。通过火山图，可以看出倍数变化和每个基因的统计显著性，以及大约多少基因具有显著性。

2. *p* 值的直方图

检测每一个基因得到的 p 值的分布提供了在整个实验中是否存在差异表达基因的信息。如果没有差异表达的基因，p 值将有一个均匀分布。过多的小 p 值表示存在差异表达基因。与火山图不同，p 值的直方图可以显示数据中的一些问题。例如，多峰的存在可能表明违反检验假设。因此，我们常常做出 p 值的直方图以供目视检查（**图 10.5D，图 10.5F**）。

10.3.9 重叠的差异表达

由于预实验中果蝇材料数量有限，我们无法得到足够的 RNA，像双通道阵列实验中通常所做的那样，对每个样品进行染色交换实验。因此，我们无法区分由于饮食影响与不同染料标记产生的影响。不过，我们认为不同染料标记不会产生重大影响，因为本实验中使用探针间接标记，与使用 Cy3 和 Cy5 标记的核苷酸探针直接标记相比，效率

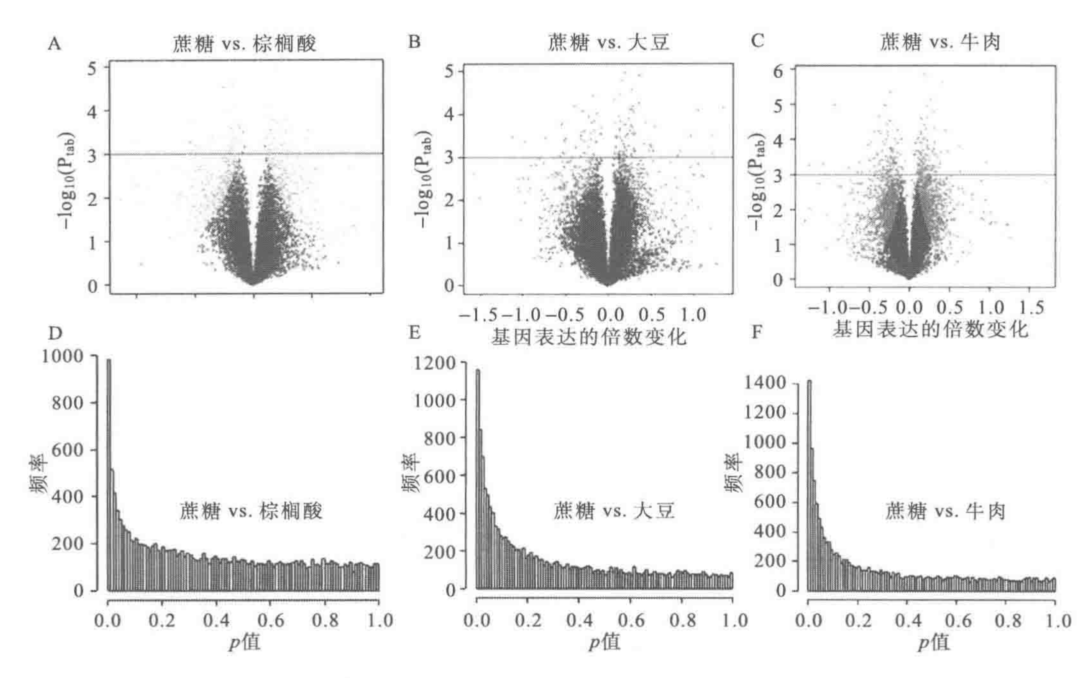


图 10.5　3种饮食饲喂10天的果蝇的火山图和直方图。火山图显示倍数变化（x 轴）和统计强度，即传统的 t 检验得到的 p 值的负对数（y 轴）。研究中使用基于收缩的 t 检验鉴定出的显著性基因用红色点表示。从基于收缩的 t 检验得到的 p 值的直方图显示每个饮食比较中过多的较小的 p 值，说明存在大量饮食影响导致的真正不同的基因（本研究设计中可能与染料的影响相混淆）

更高且引入的偏差更小。

有了上面的注意事项，我们注意到一些可能揭示基因表达的差异。对所有3个数据集使用0.1的FDR临界值，并对牛肉饮食组的数据集增设一个0.003的 p 值临界值（以减少候选基因的数目），我们编制了一张阵列元素和差异表达（与对照组相比）的相关基因的清单。我们使用相应的Flybase“gn”编码检索Gene Ontology（GO）功能注解，并确定将来可能研究的候选基因。我们使用2005年3月在www.geneontology.org下载的果蝇GO注解，该文件（gene _ association.fb）为“版本1.9.”。一些阵列元素（每次实验中约30个）不能得到FlyBase id；我们在随后的分析中舍弃这些阵列元素，因为目前还不清楚它们代表什么。

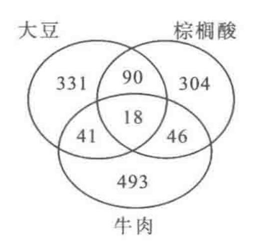


图 10.6　3种饮食与对照组相比表达改变的基因的维恩图（FDR = 0.1）。3个圆的交集为微阵列结果之间的重叠。注意，此图只表示与对照组微阵列相比表达水平发生显著改变的基因，而非过表达或低表达的基因

我们检查了不同饮食组的数据集之间差异表达基因的重叠情况。**图 10.6** 为各种饮食中差异表达基数量的维恩图。3种饮食的交集包含18个基因，其中包括一个包含若干 *lacZ* 阵列元素的假阳性基因，可以归入一个不应给出差异表达结果的

Flybase “gn” id。果蝇没有 *lacZ* 基因，但果蝇的肠道菌群很可能带有 *lacZ* 基因（基于阳性 X - gal 染色），因此，用不同的饮食饲喂宿主很可能使其肠道细菌生长水平发生变化。我们提出这个明确的假阳性结果，目的是强调在此类涉及成千上万统计检验的实验中产生假阳性是无法避免的，必须在随后的实验中筛选出去。

在进一步的研究之前，我们无法明确地就不同饮食如何影响全局基因表达模式下结论。然而，已有的结果表明，DNA 微阵列技术可以指出特定的饮食响应的特异性信号通路。完整的微阵列结果见补充文档 http://www.transvar.org/fly_chow/analysis。

10.4　讨论与前景展望

本章中讨论的全部微阵列结果都在 www.transvar.org/fly_chow/analysis 网站上。本章中讨论的软件包可以从 UAB Section on Statistical Genetics 网站上（www.soph.uab.edu/SSG），或 Jackson Laboratory（http://www.jax.org/staff/churchill/labsite/）得到，或联系 X. C. 和 A. L.。

研究结果中令人惊讶的是，在牛肉饮食组，所有果蝇成虫的三酰甘油和蛋白质水平都降低，而大豆饮食组中，雄性果蝇的总蛋白水平显著升高。另外，我们还发现实验中的 3 种饮食都显著缩短寿命，延长从虫卵发育成虫的时间，并改变全局基因表达模式（与高蔗糖对照组相比）。初步的微阵列分析显示，在 3 种实验组的饮食模式下，共有 60 个基因表达显著地改变（FDR = 0.1）。Driver 实验室之前的研究也证明了棕榈酸饮食缩短寿命的作用（***26***）。

牛肉饮食降低三酰甘油的作用与最近在人类中进行的研究结果相一致，该研究将牛肉饮食与高纤维（HC）、高脂肪（HF-Atkins）与高蛋白（HP-Zone）饮食相比较（***85***）。作者得出结论，“所有 3 种饮食都降低体重、腰围、三酰甘油和胰岛素水平，而除了胰岛素、HF 和 HP 组对这些指标的降低都显著超过 HC 组”（***85***）。大豆异黄酮也被报道能够在哺乳动物中降低三酰甘油水平（***47***），但这种作用并未出现在大豆饮食的果蝇中。

我们的解释是，从产卵到羽化的时间长度与食物的“质量”成反比，至少这适用于果蝇幼虫发育。如果这一解释是正确的，则说明对照组（高蔗糖）食物有最高的“质量”。这并不奇怪，因为果蝇通常在腐烂的水果中产卵，正如它们的名字那样。腐烂的水果中含有大量容易消化的果糖和发酵产物，如蔗糖。同样，我们对寿命结果的理解为，蔗糖是从寿命方面来说“质量”最高的食物。其他饮食可能由于需要更多能量来消化，而能量消耗会缩短寿命。我们对此并不认同，因为胰岛素受体杂合的小鼠模型中能量消耗增加，平均寿命和最大寿命却也都增加（**参考文献 *86*** 综述）。因此，食物的“质量”可能意味着果蝇发育中需要最佳微量营养素。

蔗糖-酵母饮食的“质量”可能是最高的，因为如前所述，这种饮食与果蝇所适应的天然食物最为相似。这个想法可以通过在以大豆或肉为主食的昆虫（如埋葬虫）上进行寿命和微阵列分析来检验。对结果的预测为，这些昆虫在以与它们天然饮食最相近的饮食饲喂时，幼虫期最短而寿命最长。

另一种可能性是，大豆中的异黄酮（如大豆苷元和染料木黄酮）干预果蝇中蜕皮激素的类固醇-激素信号转导。Sharpe 实验室研究环境雌激素对哺乳动物激素信号的影响几十年，他们在 2002 年发表的一篇有影响力的文章表明，大豆配方饮食降低雄性狨猴的睾酮水平（***87***）。Sharpe 在一篇综述中还提出“雌激素假说”，即这可能会导致睾丸异常和癌症（***88***）。狨猴实验的结果是最近英国的一条建议，“不鼓励对 6 个月以下的婴儿使用大豆配方奶粉”的主要原因（***89***）。

果蝇没有雌激素或睾酮，但诱导幼虫蜕皮和化蛹的蜕皮激素是一种类固醇激素。如果大豆异黄酮干扰蜕皮激素信号，这可能有助于解释为什么大豆饮食饲喂幼虫会延长虫卵到羽化的时间。然而，这不能解释为什么牛肉和棕榈酸饮食得到了类似的延长效果。此外，果蝇成虫中蜕皮激素信号的降低会延长寿命（***90～92***），然而大豆饲喂的果蝇寿命缩短，这与预期的结果相反。

初步的微阵列结果给出了很多在用不同饮食饲喂时果蝇基因表达如何变化的信息。棕榈酸、牛肉和大豆饮食改变了许多脂类代谢基因的调控。这并不奇怪，因为这 3 种饮食中脂肪含量都很高。然而，不同饮食下，改变基因的表达谱的大多数基因最不容易解释。例如，一个耐人寻味的发现是，在不同饮食下，几个嗅觉通路基因改变了表达模式。研究这些基因的突变是否影响饮食偏好将是有趣的行为学实验。

篇幅所限，我们没有使用微阵列分析的全部类型。例如，Badger 实验室最近使用微阵列实验分析高大豆饮食饲喂大鼠的特定组织中基因表达的变化（***93***）。比较高大豆饮食饲喂大鼠和果蝇的基因表达变化的 meta 分析会很有意思。此外，Partridge 实验室发表的文章对热量限制果蝇进行了综合的微阵列分析（***23***）。在这篇详尽的文章中，他们使用了多种本章未介绍的分析技术，除了存活曲线，还有死亡率相对于年龄的曲线（***23***）。此外，他们还进行了对照组或热量限制条件下基因表达随时间的改变（***23***）。另外，就基因个体发育（GO）编码以及特定 GO 编码的上调或下调的基因数量的数据的分析而言，Partridge 的论文比本章更为详细（***23***）。

本章的研究也为研究各种饮食可能的长期“代谢印迹效应”打下了基础。“代谢印迹”是一个假设，即饮食成分能够诱导长期的全局性染色质组织的改变，并导致基因表达的改变（***94***，***95***）。代谢印迹中的假设是，当诱导性的成分从饮食中除去之后，染色质的改变也将长时间存在，从而导致一个稳定的代谢状态的改变。一些证据表明，代谢印迹可以占据有机体生命中很大一部分时间，甚至可能通过基因的可遗传性表观遗传学改变遗传给后代。有人曾提出，母亲的饮食，甚至外祖母的饮食，都可能对子宫中胎儿未来肥胖的发生有一定的影响（***96***）。进一步的证据表明，肥胖在代与代之间的遗传可能由表观遗传学事件（如 DNA 甲基化）所调控，因为最近的研究发现，有肥胖倾向的克隆小鼠往往不将肥胖遗传给后代（***97***）。

我们注意到，我们所选择的每种营养素（蔗糖、棕榈酸、大豆或牛肉）的特定浓度限制了对本章介绍的饮食实验的阐释。在展开一个有意义的推论之前，可能需要用不同浓度的各种营养素饲喂果蝇，并获得一系列寿命数据。例如，可以查看已发表的饮食限制果蝇的数据（***98***，***99***）。当由 15%（*m/V*）酵母-蔗糖组成的高营养培养基被稀释时，寿命增加而繁殖下降（饮食限制效应），直到这个比例下降到 5%～7%（*m/V*）浓度

(**98**, **99**)。进一步的稀释导致寿命减少，这大概是营养不良的结果。因此，酵母-蔗糖浓度和寿命之间存在一个下凹的抛物线关系（**98**，**99**）。从而可以在逻辑上得出结论：当选择两种不同浓度的饮食时，低浓度一组可能寿命较短，也可能较长，也可能与高浓度组有相同的寿命。

然而，支持我们在高浓度使用等热量饮食的是最近的一项研究，该研究称，很多情况下，动物完全会通过增加摄食来补偿稀释食物的作用（**100**）。Carvalho 和同事证明，饮食限制会引起摄食量的显著的代偿性改变（**100**）。因此，饲喂行为和营养成分一致地影响果蝇寿命。我们认为，本章描述的用不同成分的等热量饮食饲喂，与大多数寿命研究青睐的通过稀释的饮食限制相比，可能是一个更好的对照实验。尽管饮食限制和饮食结构研究都以等量的食物摄入为假设，但在饮食限制的研究中这个假设显然是不正确的（**100**），而对于本章所述的等热量饮食，这一假设是有效的。我们主张，无论使用哪种方法，都需要控制食物的摄入量（**100**）。

尽管之前的研究已经证明，用果蝇作为研究营养基因组学和寿命研究的模型有诸多显而易见的好处，仍然可能有人对在果蝇中进行这些研究存在异议。比如说，可以提出这样一个观点，我们在研究中使用各种“非天然”的食物来源（棕榈酸、大豆、牛肉），并发现它们减缓发育并缩短成虫寿命。由于果蝇以酵母为食，在用这些非天然的食物来源饲喂时有一定程度的营养不良是不足为奇的。然而，这种说法忽略了一点，即我们的研究重点是最终实现人类和果蝇之间的比较代谢研究。野生果蝇的食物主要为发酵水果中的酵母，豆腐和牛肉不是这个物种的“天然”食品，但什么是“天然”的人类食物呢？Elaine Morgan 在她的有争议的书 *The Aquatic Ape*：*A Theory of Human Evolution*（《水生猿：人类进化的理论》）中认为，这种“无毛”的人类祖先，同海豚和鲸鱼一样，最初都是主要吃鱼的水生动物（**101**）。这一有争议的假说的证据是，人类必须摄入足够的花生酸（一种 20 个碳的单不饱和脂肪酸）和其他主要存在于鱼类中的 ω-3 脂肪酸，以供大脑和身体的正常发育（**102～105**）。不管这些关于人类进化的假设是否正确，对人类和果蝇而言，豆腐和牛肉几乎肯定属于“非天然”食物。许多人类食物是非天然的，尤其是那些受很多美国人的青睐的极端的饮食，进一步说明了进行比较“天然”和“非天然”食物的营养基因组学研究的必要性。

然而，在将果蝇营养基因组学研究结果应用在人类时应当小心谨慎。人类和果蝇的饮食需求有很大不同，这种区别甚至在两种昆虫或两种哺乳动物物种之间都是很大的。不过，我们相信，我们的发现会促进营养基因组学领域的研究，并将有助于识别连接饮食和代谢的进化上保守的机制。

致谢

我们感谢 T. Tollefsbol 邀请我们参与这个出版项目，以及 Cancer Center Gene Expression Shared Facility 的主任 Lihong Teng 博士进行初步的果蝇微阵列实验，以及 Malinda Gilmore 博士对手稿的批判性阅读。我们实验室的研究得到了 NIH 拨款 R01ES92133 和 R01CA105349 和 Soy Health Research Foundation 对 D. M. R. 拨款的支持，NIH 对 X. L. 的拨款 P50DK057301，以及 UAB-CNGI 对 M. D. G. 的拨款。

参考文献

1. Jenkins，D. J.，Kendall，C. W.，Marchie，A.，et al.（2003）Effects of a dietary portfolio of cholesterol-lowering foods vs lovastatin on serum lipids and C-reactive protein. [see comment]. *JAMA* **290**，502-510.
2. Jenkins，D. J.，Kendall，C. W.，Marchie，A.，Augustin，L. S.（2004）Too much sugar，too much carbohydrate，or just too much? [comment]. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**，711-712.
3. Jenkins，D. J.，Kendall，C. W.，Marchie，A.，et al.（2003）Type 2 diabetes and the vegetarian diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **78（3 Suppl）**，610S-616S.
4. Hung，T.，Sievenpiper，J. L.，Marchie，A.，Kendall，C. W.，and Jenkins，D. J.（2003）Fat versus carbohydrate in insulin resistance，obesity，diabetes and cardiovascular disease. [see comment]. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabol. Care* **6**，165-176.
5. Jenkins，D. J.，Kendall，C. W.，Faulkner，D.，et al.（2002）A dietary portfolio approach to cholesterol reduction：combined effects of plant sterols，vegetable proteins，and viscous fibers in hypercholesterolemia. *Metab. Clin. Exp.* **51**，1596-1604.
6. Ruden，D. M.，De Luca，M.，Garfinkel，M. D.，Bynum，K.，and Lu，X.（2005）Drosophila nutrigenomics can provide clues to human gene-nutrient interactions. *Ann. Rev. Nutr.* **25**，21. 1-21. 4.
7. Canavoso，L. E.，Jouni，Z. E.，Karnas，K. J.，Pennington，J. E.，and Wells，M. A.（2001）Fat metabolism in insects. *Ann. Rev. Nutr.* **21**，23-46.
8. Arrese，E. L.，Canavoso，L. E.，Jouni，Z. E.，Pennington，J. E.，Tsuchida，K.，and Wells，M. A.（2001）Lipid storage and mobilization in insects：current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**，7-17.
9. Canavoso，L. E. and Wells，M. A.（2000）Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval Manduca sexta. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**，1173-1180.
10. Canavoso，L. E.，Bertello，L. E.，de Lederkremer，R. M.，and Rubiolo，E. R.（1998）Effect of fasting on the composition of the fat body lipid of Dipetalogaster maximus，Triatoma infestans and Panstrongylus megistus（Hemiptera：Reduviidae）. *J. Comp. Physiol. B，Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **168**，549-554.
11. Parks，A. L.，Cook，K. R.，Belvin，M.，et al.（2004）Systematic generation of highresolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome. *Nat. Genet.* **36**，288-292.
12. Bier，E.（2005）Drosophila，the golden bug，emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **6**，9-23.
13. Sun，L. V.，Chen，L.，Greil，F.，et al.（2003）Protein-DNA interaction mapping using genomic tiling path microarrays in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**，9428-9433.
14. Mehta，T.，Tanik，M.，Allison，D. B.（2004）Towards sound epistemological foundations of statistical methods for high-dimensional biology. *Nat. Genet.* **36**，943-947.
15. Ashburner，M.（1989）*Drosophila：A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，NY.
16. Rogina，B.，Helfand，S. L.，and Frankel，S.（2002）Longevity regulation by Drosophila Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* **298**，1745.
17. Tatar，M.，Bartke，A.，and Antebi，A.（2003）The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* **299**，1346-1351.
18. Mair，W.，Goymer，P.，Pletcher，S. D.，and Partridge，L.（2003）Demography of dietary restriction and death in Drosophila. [see comment]. *Science* **301**，1731-1733.
19. Wood，J. G.，Rogina，B.，Lavu，S.，et al.（2004）Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. [erratum appears in Nature. 2004 Sep 2；431（7004）：107]. *Nature* **430**，686-689.
20. Magwere，T.，Chapman，T.，and Partridge，L.（2004）Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male Drosophila melanogaster. *J. Gerontol. A，Biol. Sci. Med. Sci.* **59**，

3-9.

21. Finch, C. E. and Ruvkun, G. (2001) The genetics of aging. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 435-462.
22. Inoue, K., Fei, Y. J., Huang, W., Zhuang, L., Chen, Z., and Ganapathy, V. (2002) Functional identity of Drosophila melanogaster Indy as a cation-independent, electroneutral transporter for tricarboxylic acid-cycle intermediates. *Biochem. J.* **367 (Pt 2)**, 313-319.
23. Pletcher, S. D., Macdonald, S. J., Marguerie, R., et al. (2002) Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted Drosophila melanogaster. *Curr. Biol.* **12**, 712-723.
24. Driver, C. J. I. and Cosopodiotis, G. (1979) The effect of dietary fat on longevity of Drosophila melanogaster. *Exp. Gerontol.* **14**, 95-100.
25. Driver, C. J. and Lamb, M. J. (1980) Metabolic changes in ageing Drosophila melanogaster. *Exp. Gerontol.* **15**, 167-175.
26. Driver, C. J., Wallis, R., Cosopodiotis, G., and Ettershank, G. (1986) Is a fat metabolite the major diet dependent accelerator of aging? *Exp. Gerontol.* **21**, 497-507.
27. Tu, M. P. and Tatar, M. (2003) Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult Drosophila melanogaster. *Aging Cell* **2**, 327-333.
28. U. S. Food and Drug Administration (1999) Food Labeling Health Claims; Protein and Coronary Heart Disease; Final Rule.
29. United States. Dept. of Health and Human Services., United States. Dept. of Agriculture., United States. Dietary Guidelines Advisory Committee. (2005) Dietary guidelines for Americans, [6th ed.] Washington, D. C.: G. P. O.; 2005.
30. Yzebe, D. and Lievre, M. (2004) Fish oils in the care of coronary heart disease patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. Fundamental & Clinical Pharmacology **18**, 581-592.
31. Siddiqui, R. A., Shaikh, S. R., Sech, L. A., Yount, H. R., Stillwell, W., and Zaloga, G. P. (2004) Omega 3-fatty acids: health benefits and cellular mechanisms of action. *Mini Rev. Med. Chem.* **4 (8)**, 859-871.
32. von Schacky, C. (2004) Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7 (2)**, 131-136.
33. Young, C. and Martin, A. (2003) Omega-3 fatty acids in mood disorders: an overview. *Revista Brasileira de Psiquiatria* **25 (3)**, 184-187.
34. McGrath-Hanna, N. K., Greene, D. M., Tavernier, R. J., Bult-Ito, A. (2003) Diet and mental health in the Arctic: is diet an important risk factor for mental health in circumpolar peoples? —a review. *Int. J. Circumpolar Health* **62 (3)**, 228-241.
35. Fenwick, D. E. and Oakenfull, D. (1983) Saponin content of food plants and some prepared foods. *J. Sci. Food Agric.* **34 (2)**, 186-191.
36. Anderson, R. L. and Wolf, W. J. (1995) Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr.* **125 (3 Suppl)**, 581S-588S.
37. Greaves, K. A., Parks, J. S., Williams, J. K., and Wagner, J. D. (1999) Intact dietary soy protein, but not adding an isoflavone-rich soy extract to casein, improves plasma lipids in ovariectomized cynomolgus monkeys. [see comment]. *J. Nutr.* **129 (8)**, 1585-1592.
38. Lucas, E. A., Khalil, D. A., Daggy, B. P., and Arjmandi, B. H. (2001) Ethanolextracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. [see comment]. *J. Nutr.* **131 (2)**, 211-214.
39. Oakenfull, D. and Sidhu, G. S. (1990) Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *Eur. J. Clin. Nutr.* **44 (1)**, 79-88.
40. Sidhu, G. S. and Oakenfull, D. G. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *Br. J. Nutr.* **55 (3)**, 643-649.

41. Oakenfull, D. G. and Topping, D. L. (1983) Saponins and plasma cholesterol. *Atherosclerosis* **48** (**3**), 301-303.
42. Hood, R. L., Oakenfull, D. G., and Topping, D. L. (1979) Dietary saponins and plasma cholesterol. *Proc. Nutr. Soc.* **38** (**2**), 78A.
43. Potter, J. D., Topping, D. L., and Oakenfull, D. (1979) Soya, saponins, and plasmacholesterol. *Lancet* **1** (**8109**), 223.
44. Wagner, J. D., Schwenke, D. C., Greaves, K. A., et al. (2003) Soy protein with isoflavones, but not an isoflavone-rich supplement, improves arterial low-density lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23** (**12**), 2241-2246.
45. Wagner, J. D., Zhang, L., Greaves, K. A., Shadoan, M. K., and Schwenke, D. C. (2000) Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. *Metab. Clin. Exp.* **49** (**9**), 1188-1196.
46. Yousef, M. I., Esmail, A. M., and Baghdadi, H. H. (2004) Effect of isoflavones on reproductive performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma biochemistry of male rabbits. *J Environ. Sci. Health B* **39** (**5-6**), 819-833.
47. Yousef, M. I., Kamel, K. I., Esmail, A. M., and Baghdadi, H. H. (2004) Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food Chem. Toxicol.* **42** (**9**), 1497-1503.
48. Adlercreutz, H. (1998) Evolution, nutrition, intestinal microflora, and prevention of cancer: a hypothesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217** (**3**), 241-246.
49. Adlercreutz, H. (1990) Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Supplement* **201**, 3-23.
50. Boyle, P., Maisonneuve, P., and Napalkov, P. (1995) Geographical and temporal patterns of incidence and mortality from prostate cancer. *Urology* **46** (**3 Suppl A**), 47-55.
51. Napalkov, P., Maisonneuve, P., and Boyle, P. (1995) Worldwide patterns of prevalence and mortality from benign prostatic hyperplasia. *Urology* **46** (**3 Suppl A**), 41-46.
52. Boyle, P. and Napalkov, P. (1995) The epidemiology of benign prostatic hyperplasia and observations on concomitant hypertension. *Scand. J. Urol. Nephrol. Supplementum* **168**, 7-12.
53. Boyle, P., Maisonneuve, P., and Napalkov, P. (1996) Incidence of prostate cancer will double by the year 2030: the argument for. *Eur. Neurol.* **29** (**Suppl 2**), 3-9.
54. Griffiths, K. (2000) Estrogens and prostatic disease. International Prostate Health Council Study Group. *Prostate* **45** (**2**), 87-100.
55. Dai, Q., Shu, X. O., Jin, F., et al. (2001) Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br. J. Cancer* **85** (**3**), 372-378.
56. Atkins, R. C. (2002) *Dr. Atkins' New Diet Revolution*. Avon, New York.
57. Agatston, A. (2003) *The South Beach Diet*. Random House, New York.
58. Eades, M. R. and Eades, M. D. (1996) Protein Power. Bantam, New York.
59. Willett, W. C. (2004) Reduced-carbohydrate diets: no roll in weight management [comment]. *Ann. Int. Med.* **140** (**10**), 836-837.
60. Feinman, R. D. and Fine, E. J. (2004) "A calorie is a calorie" violates the second law of thermodynamics. *Nutrition J* **3** (**9**), 1-5.
61. Jequier, E. (2002) Pathways to obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **26** (**Suppl 2**), S12-S17.
62. Flegal, K. M., Graubard, B. I., Williamson, D. F., and Gail, M. H. (2005) Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* **293** (**15**), 1861-1867.
63. Mittler, S. (1979) Failure of irradiated beef and ham to induce genetic aberrations in Drosophila. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **35** (**6**), 583-588.
64. Reyes, N., Iatropoulos, M., Mittelman, A., and Geliebter, J. (2002) Microarray analysis of diet-induced alter-

ations in gene expression in the ACI rat prostate. European Journal of Cancer Prevention **11** (**Suppl 2**), S37-S42.

65. Zhang, X. B., Tao, K., Urlando, C., Shaver-Walker, P., and Heddle, J. A. (1996) Mutagenicity of high fat diets in the colon and small intestine of transgenic mice. *Mutagenesis* **11** (**1**), 43-48.
66. Ruby, S., Mendoza, L. T., Fournier, M., Brousseau, P., and Degas, V. (2003) Reproductive system impairment of mice fed diets containing beluga whale blubber from the St Lawrence estuary and arctic populations. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **66** (**11**), 1073-1085.
67. Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., et al. (2004) A complementary transposon tool kit for Drosophila melanogaster using P and piggyBac. [see comment]. *Nat. Genet.* **36** (**3**), 283-287.
68. Clark, A. G. and Keith, L. E. (1988) Variation among extracted lines of Drosophila melanogaster in triacylglycerol and carbohydrate storage. *Genetics* **119** (**3**), 595-607.
69. Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., et al. (2005) Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1alphaOHase-deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288** (**2**), C429-C434.
70. Ascencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gomez-Perez, F. J., Hernandez-Pando, R., and Tovar, A. R. (2004) Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.* **134** (**3**), 522-529.
71. Tatematsu, K., Fuma, S. Y., Satoh, J., Ichikawa, Y., Fujii, Y., and Okuyama, H. (2004) Dietary canola and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups. *J. Nutr.* **134** (**6**), 1347-1352.
72. Colombani, P. C. (2004) Glycemic index and load-dynamic dietary guidelines in the context of diseases. *Physiol. Behav.* **83** (**4**), 603-610.
73. Partridge, L., Pletcher, S. D., and Mair, W. (2005) Dietary restriction, mortality trajectories, risk and damage. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 35-41.
74. Curtsinger, J. W., Fukui, H. H., Khazaeli, A. A., et al. (1995) Genetic variation and aging. *Ann. Rev. Genet.* **29**, 553-575.
75. Tatar, M., Promislow, D. E., Khazaeli, A. A., and Curtsinger, J. W. (1996) Agespecific patterns of genetic variance in Drosophila melanogaster. Ⅱ. Fecundity and its genetic covariance with age-specific mortality. *Genetics* **143** (**2**), 849-858.
76. Promislow, D. E., Smith, E. A., and Pearse, L. (1998) Adult fitness consequences of sexual selection in Drosophila melanogaster. *Proc. Natil. Acad. Sci. USA* **95** (**18**), 10, 687-10, 692.
77. Garfinkel, M. D., Sollars, V. E., Lu, X., and Ruden, D. M. (2004) Multigenerational selection and detection of altered histone acetylation and methylation patterns: toward a quantitative epigenetics in Drosophila. *Methods Mol. Biol.* **287**, 151-168.
78. Carver, R. H. and Nash, J. G. (2005) Doing data analysis with SPSS version 12. 0. Thomson/Brooks/Cole, Belmont, CA.
79. Koochmeshgi, J., Ladonni, S., and Hosseini-Mazinani, S. M. (2004) Investigations on the nature of the cost of reproduction: susceptibility to heat stress in fruitflies. *Ann. NY Acad. Sci.* **1019**, 368-369.
80. Bauer, J. H., Goupil, S., Garber, G. B., and Helfand, S. L. (2004) An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (**35**), 12, 980-12, 985.
81. Cui, X. and Churchill, G. A. (2003) Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol.* **4** (**4**), 210.
82. Cui, X., Hwang, J. T. G., Qiu, J., Blades, N. J., and Churchill, G. A. (2005) Improved statistical tests for differential gene expression by shrinking variance component estimates. *Biostatistics* **6** (**1**), 59-75.
83. Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001) Controlling the false discovery rate in

behavior genetics research. [comment]. *Behav. Brain Res.* **125** (**1-2**), 279-284.

84. Wolfinger, R. D., Gibson, G., Wolfinger, E. D., et al. (2001) Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J. Comput. Biol.* **8** (**6**), 625-637.
85. McAuley, K. A., Hopkins, C. M., Smith, K. J., et al. (2005) Comparison of highfat and high-protein diets with a high-carbohydrate diet in insulin-resistant obese women. *Diabetologia* **48** (**1**), 8-16.
86. Liang, H., Masoro, E. J., Nelson, J. F., Strong, R., McMahan, C. A., and Richardson, A. (2003) Genetic mouse models of extended lifespan. *Exp. Gerontol.* **38**, 1353-1364.
87. Sharpe, R. M., Martin, B., Morris, K., et al. (2002) Infant feeding with soy formula milk: effects on the testis and on blood testosterone levels in marmoset monkeys during the period of neonatal testicular activity. *Hum. Reprod.* **17**, 1692-1703.
88. Sharpe, R. M. (2003) The 'oestrogen hypothesis'—where do we stand now? *Int. J. Androl.* **26**, 2-15.
89. The British Dietetic Association. (2003) Paediatric group position statement on the use of soya protein for infants. *J. Fam. Health Care* **13**, 93.
90. Simon, A. F., Shih, C., Mack, A., and Benzer, S. (2003) Steroid control of longevity in Drosophila melanogaster. *Science* **299**, 1407-1410.
91. Tatar, M. (2003) Unearthing loci that influence life span. *Sci. Aging Knowledge Environ.* **2003** (**9**), PE5.
92. Tatar, M. (2004) The neuroendocrine regulation of Drosophila aging. *Exp. Gerontol.* **39**, 1745-1750.
93. Xiao, R., Badger, T. M., and Simmen, F. A. (2005) Dietary exposure to soy or whey proteins alters colonic global gene expression profiles during rat colon tumorigenesis. *Mol. Cancer* **4** (**1**), 1-17.
94. Levin, B. E. (2000) Metabolic imprinting on genetically predisposed neural circuits perpetuates obesity. *Nutrition* **16**, 909-915.
95. Levin, B. E. (2000) The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obes. Res.* **8**, 342-347.
96. Finch, C. E. and Loehlin, J. C. (1998) Environmental influences that may precede fertilization: a first examination of the prezygotic hypothesis from maternal age influences on twins. *Behav. Genet.* **28**, 101-106.
97. Inui, A. (2003) Obesity—a chronic health problem in cloned mice? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 77-80.
98. Partridge, L., Piper, M. D., and Mair, W. (2005) Dietary restriction in Drosophila. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 938-950.
99. Piper, M. D., Mair, W., and Partridge, L. (2005) Counting the calories: the role of specific nutrients in extension of life span by food restriction. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **60**, 549-555.
100. Carvalho, G. B., Kapahi, P., and Benzer, S. (2005) Compensatory ingestion upon dietary restriction in Drosophila melanogaster. *Nat. Methods* **2**, 813-815.
101. Morgan E. (1982) The aquatic ape: a theory of human evolution. Souvenir Press, London.
102. Bourre, J. M. (2005) Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *J. Nutr. Health Aging* **9**, 31-38.
103. Bourre, J. M. (2005) Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what is actually useful? *J. Nutr. Health Aging* **9**, 232-242.
104. Bourre, J. M. (2004) Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *J. Nutr. Health Aging* **8**, 163-174.
105. Bourre, J. M. and Dumont, O. (2003) Dietary oleic acid not used during brain development and in adult in rat, in contrast with sciatic nerve. *Neurosci. Lett.* **336**, 180-184.
106. SPSS Inc. (1997) SPSS advanced statistics 7.5. SPSS Inc. : Chicago.

第11章　热量限制模拟：一种生物老年学研究中的新方法

Caloric Restriction Mimetics：*A Novel Approach for Biogerontology*

Mark A. Lane，George S. Roth，Donald K. Ingram

摘要　热量限制是唯一的、持续性的、可重现并能够广泛地延长物种的平均和最大寿命的非遗传学干预途径。但即使它可以应用于人类衰老问题，大多数人也不太可能保持减少30%～40%的食物摄入以满足这种干预方法的需要，因此，需要另一种可供选择的方法。我们在1998年首次提出热量限制（CR）模拟的概念。这一概念引入之后，该研究领域受到了学术界、政府机构以及私人部门的广泛关注。CR模拟以改变能量代谢通路为目的，能够在不明显减少进食量的情况下模拟CR促进健康和延缓衰老的效果。如今，候选的CR模拟方法包括糖酵解抑制剂、抗氧化剂和特定基因调节因子，研究已确认这些方法的应用潜力。

关键词　饮食限制；老化；2-脱氧-D-葡萄糖；寿命；新陈代谢

11.1　引言

众所周知，一直以来，热量限制（CR）是唯一的最有效的非遗传学干预衰老的方法，它可重现地广泛延长多种物种，包括哺乳动物的平均和最大寿命（*1*）。CR与其他方法的一个重要区别在于，既可增加平均寿命也可增加最大寿命。有许多干预手段可以延长动物和人类的平均寿命。从20世纪前十年的早期到如今，发达国家男性和女性的平均寿命从40岁左右增加到80岁。这主要归功于医疗护理的进步（抗生素、疫苗等），降低了早期死亡率，并提升了营养和整体健康水平。尽管人类的平均寿命显著增加，最大寿命（假定由遗传决定）仍保持在固定的120岁左右。可以说，影响平均寿命的干预手段是通过改变与年龄相关的病理过程和年龄相关疾病来实现，而像CR这样，同时增加最大寿命的干预手段，则是从根本上改变了生物衰老的基础。因此，CR不仅是延长寿命和延迟衰老中最强大的干预手段，也可能成为探索衰老的基础生物学机制中一种重要工具。

11.2　热量限制的实验模型和对人类的适用性

过去的70年里，已有数百个实验报道了CR的寿命延长作用及其他益处。例如，

抗肿瘤和维持年轻生理状态。尽管如此，在获得确切的人类数据之前，仍然无法确定 CR 与人类的关系（**2**）。然而，一些数据资料显示，CR 可能与人类衰老有关联。例如，基于对西班牙疗养院居住者的研究，Vallejo（**3**）得到的结论是减少热量摄入与死亡率的显著降低相关，而且热量供给最低一组的死亡率最低。日本 Okinawa 岛上的居民（成人和儿童）热量摄入比全国的平均值低 20%～40%（**4**）。有趣的是，Okinawa 岛上百岁以上老人的比例更高，整体死亡率更低，死于血管疾病和癌症的人数则更少。尽管这些都是很大程度上不可控的研究，但是它们确实暗示了热量摄入、疾病、甚至是长寿之间可能存在联系。

研究人员正在使用非人类的灵长动物，主要是恒河猴来进行可控性更强的研究。恒河猴和人类的亲缘更接近，这些研究将更清晰地揭示 CR 与人类的关联。灵长类动物的研究数据见**参考文献 5** 综述，在此不予赘述。简要地说，CR 猴子的很多生理反应与啮齿动物中观察到的一致。例如，体重减轻、肥胖减少，空腹葡萄糖和胰岛素水平降低，体温以及血清参数的变化（如胆固醇和三酰甘油）等（**表 11.1**）。新的研究数据暗示 CR 可能对年龄相关疾病有积极影响，并降低相关发病率甚至死亡率（**5**，**6**）。

表 11.1　恒河猴中热量限制对一些形态学、生理学、衰老和疾病参数的影响

分类/参数	降低	升高	无变化
身体成分			
体重	X		
脂肪与瘦体重	X		
躯干：腿部脂肪比率	X		
身高	X		
发育			
性成熟时间		X	
骨骼成熟时间		X	
新陈代谢			
代谢率（短期）	X		
代谢率（长期）			X
代谢率（长期：夜间）	X		
体温	X		
三碘甲状腺原氨酸（T3）	X		
甲状腺素（T4）			X
促甲状腺激素（TSH）			X
瘦素	X		
内分泌			
空腹血糖/胰岛素	X		
IGF-1/生长激素	X		
胰岛素敏感性		X	
年龄相关褪黑素和 DHEAS 的保持		X	
睾酮；雌二醇			X
心血管参数			
血压收缩压	X		

续表

分类/参数	降低	升高	无变化
心率	X		
血清三酰甘油	X		
血清 HDL2B		X	
LDL 与蛋白多糖的相互作用	X		
脂蛋白（a）	X		
免疫学参数			
IL-6	X		
IL-10	X		
干扰素-γ		X	
氧化应激			
骨骼肌的氧化损伤	X		
细胞生物学			
成纤维细胞的增殖能力		X	
糖化作用产物	X		
功能评测			
运动能力			X
听觉反应		X	

注："X"标注了热量限制中选定参数降低、增高或无变化。

Baltimore Longitudinal Study of Aging 中对男性的研究也证明了 CR 和人类衰老之间的联系。我们与 NIA 的同事一道，正在研究 CR 在动物体内最有力的 3 个生理标志物是否与人类生存率相关。在非 CR 的正常人群中，空腹胰岛素水平和体温的降低，以及持续高水平的肾上腺类固醇激素和脱氢异雄酮硫酸盐（DHEAS）与更高的生存率相关联（*7*）。人类中的短期研究显示，短期 CR 中可以观察到这 3 个标志物参数中的两个（空腹胰岛素水平和体温降低）（*8*）。总体来说，这些发现很好地预示了 CR 可能确实有延长寿命并且延缓很多年龄相关病理过程的作用。

为了从 CR 中获得最大的益处（假定 CR 也适用于人类），人们大约需要减少 30% 的热量摄入，即从每天大约 2500 kcal 减少到 1750 kcal（对男性而言）。节食书籍、药物和与减重相关的产品极度流行说明，大范围使用这样的食物疗法会面临很大的挑战。因此，需要其他的能够获得 CR 潜在益处的方法。考虑到 CR 可能的生物学机制，我们提出"模拟"CR 效应的假设，即通过改变细胞能量代谢，有可能"诱骗"身体在不减少食物摄入的情况下转变到一种类似 CR 的存活模式（*9*）。

11.3 热量限制模拟

我们在 1998 年首次提出了 CR 模拟的设想（*10*），随后在 *Scientific American* 的文章（*11*）中扩展了这一潜在方法。在最初的研究中，我们报道了用葡萄糖类似物 2-脱氧-D-葡萄糖（2DG）饲喂大鼠 6 个月，造成细胞葡萄糖代谢（如糖酵解）的中断，在我们所选择的 2DG 浓度下，大鼠体温和空腹胰岛素水平降低，同时摄食并没有显著

减少（***10***）。6 个月的研究持续时间虽然不足以评价生物学衰老或长寿的指标，但确实证实了在不减少食物摄入的情况下“模拟”CR 的代谢效果是可能的。接下来，我们又在大鼠上进行了存活率实验，但令人遗憾的是，2DG 的有效 CR 模拟浓度与产生毒性的浓度过于接近，因此没有实际应用的价值。CR 模拟的概念在其他实验中得到了进一步验证。例如，与 CR 的作用相似，2DG 在神经中毒和缺血的啮齿动物模型中表现出神经保护性（***12***，***13***），碘乙酸通过中断糖酵解中的一种不同的酶，从而保护神经免于谷氨酸毒性（***14***）。因此，在不减少正常的食物摄入的条件下模拟 CR 的代谢和保护效应是有可能的。

越来越多的老年学研究文献中使用“CR 模拟”这一术语，但其中 CR 模拟的定义不够严谨，往往指任何导致与 CR 相似的寿命延长的遗传或其他干预手段。很多情况下，无从知晓所检测的干预手段是否同时减少了食物或能量摄入，这使得我们无法确定得到的结果是 CR 模拟的效果，还是能量摄入降低（CR）的效果。我们认为，CR 模拟对食物摄入的影响必须有一定限度，而且 CR 模拟的目的必须是特异性地改变能量代谢，因为普遍认为，CR 种种有益效果的营养学因素就是能量。还有很重要的一点是，为了有效地模拟 CR 并潜在影响衰老的根本过程，候选的模拟方法必须同时提高平均寿命和最大寿命。提出这些重要的观点的目的并不是限制可能的 CR 模拟方法的范围，而是为了确保候选的 CR 模拟方法目的明确，且能恰当地评估。

11.3.1　可能的 CR 模拟的代谢靶点

目前提出的 CR 模拟方法以许多能量代谢相关的通路作为靶点，如糖酵解抑制剂、抗氧化剂、sirtuin 调控剂、胰岛素增敏剂等。如前面所总结的那样，尽管 2DG 的结果令人失望，糖酵解抑制仍是很有前途的靶点。基于流行且被广泛接受的衰老的自由基理论，抗氧化剂已经成为许多生物老年学研究中的焦点（***15***）。

抗氧化剂处理有时能够表现出提高平均寿命的效果，但是尚未观察到可重现的同时提高平均和最大寿命的结果。

sirtuin 作为基因沉默子，越来越多的证据支持它在短寿命生物体的衰老和寿命延长中所扮演的角色（***16***）。胰岛素敏感性的提升是对营养干预的最迅速强大的响应之一，因此胰岛素增敏剂可能也作用于模拟 CR。苯乙双胍，一种糖尿病治疗药物，在体外实验中抑制海马神经元对谷氨酸的钙应答，并提高其对兴奋毒性的耐受性（***17***）。苯乙双胍体内处理的研究无法得出其与 CR 和寿命标志物相关的结论。不过，至少有一个研究已经证明苯乙双胍能减少活性氧族（***18***）。

鉴于代谢通路及其在不同组织中调控方式繁多，因此以单独通路为靶点的 CR 模拟似乎不太可能产生 CR 全部的有益效果。例如，可能有必要同时以葡萄糖和脂肪代谢通路为靶点，以在不减少食物摄入的情况下获得 CR 的全部益处。因此，可以想象，含有多种候选的“部分的”CR 模拟组合成的“鸡尾酒”方法，可以用于更全面地复制 CR 的效果（***19***）。

除了在寿命和衰老上明显的潜在益处之外，CR 模拟还能够在分子水平探测衰老。CR 作为这样的探针有一定局限性，因为热量限制作用在整个生物体水平，而分子水平

的研究需要取机体内的组织。这限制了特定类型的分子研究。进一步验证之后，这种方法能够让分子老年学家在亚细胞水平探测生物学衰老过程，因而具有明显优势，并可能最终促使模拟 CR 的药物的发展。

11.4 结论

CR 依然是最强大的唯一能同时延长平均和最大寿命的可重现的干预手段，并且能够改变衰老的基础生物学。此外，CR 持续延缓许多随年龄增长发生的生理学和病理学改变，维持生物体的健康和活力。最近对猴子和人类的实验显示，能量限制确实可能影响人类衰老。但即使 CR 确实能够有效干预人类衰老过程，也不太可能让大范围人群在大部分生命时间里减少 30%～40%的热量摄入以延长寿命并最大程度获得 CR 的益处。CR 模拟是另一种延缓人类衰老的策略。早期的使用糖酵解抑制剂和其他化合物的实验已经确认了这种方法潜在的应用价值，而且帮助拓宽了真正的 CR 模拟研究。一种单独的候选 CR 模拟方法似乎不可能产生真正 CR 所有的有益效果，但几种组合而成的“鸡尾酒”方法或许是可行的，并且可能最终成为最成功的手段。CR 模拟也可能是生物老年学家研究衰老的分子机制的重要工具。

参考文献

1. Weindruch, R. and Walford, R. (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Thomas, Springfield, IL.
2. Roth, G. S., Ingram, D. K., and Lane, M. A. (1999) Calorie restriction in primates: will it work and how will we know? *J. Am. Geriatr. Soc.* **47**, 896-903.
3. Vallejo, E. A. (1957) La Dieta de Hombre a Dias Alterno in a la Alimentacion de Los Viejos. *Rev. Clin. Exp.* **63**, 25-49.
4. Kagawa, Y. (1978) Impact of Westernization on the nutrients of Japanese: changes in physique, cancer, longevity, and centenarians. *Prev. Med.* **7**, 205-227.
5. Lane, M. A., Mattision, J., Ingram, D. K., and Roth, G. K. (2002) Caloric restriction and aging in primates: relevance to humans and possible CR mimetics. *Micros. Res. Tech.* **59**, 335-338.
6. Black, A., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Ingram, D. K., Roth, G. S., and Lane, M. A. (2000) Calorie restriction reduces the incidence of proliferative disease: preliminary data from the NIA CR in nonhuman primate study (abstract). *Gerontologist* **40**, 5.
7. Roth, G. S., Lane, M. A., Ingram, D. K., et al. (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science* **297**, 881.
8. Heilbronn, L. (2004) *Paper presented at the 33rd Annual Meeting of the American Aging Association*, St. Petersburg, FL.
9. Roth, G. S., Ingram, D. K., and Lane, M. A. (1995) Slowing ageing by caloric restriction. *Nat. Med.* **1 (5)**, 414-415.
10. Lane, M. A., Ingram, D. K., and Roth, G. S. (1998) 2-D-oxy-D-glucose feeding in rats mimics physiological effects of calorie restriction. *J. Anti-Aging Med.* **1**, 327-337.
11. Lane, M. A., Ingram, D. K., and Roth, G. S. (2002) The serious search for an antiaging pill. *Sci. Am.* 24-29.
12. Duan, W. and Mattson, M. P. (1999) Dietary restriction and 2-deoxyglocse administration improve outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson' s disease. *J. Neurosci. Res.* **57**, 195-206.

13. Lee, J. Bruce-Keller, A. J. , Kruman, Y. , Chan, S. L. , and Mattson, M. P. (1999) 2-Deoxy-D-Glucose protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: evidence for involvement of stress proteins. *J. Neurosci. Res.* **57**, 48-61.

14. Guo, Z. , Lane, M. A. , and Mattson, M. P. (2001) The glycolysis inhibitor Iiodoacetate protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative injury: involvement of heat shock proteins and BCL-2. *J. Neurochem.* **79**, 361-370.

15. Berger, M. M. (2005) Can oxidative damage be treated nutritionally. *Clin Nutr.* **24**, 530-531.

16. Guarente, L. and Picard, F. (2005) Calorie restriction-the SIR2 connection. *Cell*, **120**, 473-482.

17. Lee J. , Chan S. L. , Lu C. , Lane M. A. , and Mattson M. P. (2002) Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity. *Exp. Neurol.* **175**, 161-167.

18. Anisimov, V. N. , Ukraintseva, S. V. , Anikin, I. V. , et al. (2005) Effect of phentermin and phenformin on biomarkers of aging in rats, *Gerontology* **51**, 19-28.

19. Roth, G. S. , Lane, M. A. , and Ingram, D. K. (2005) Caloric restriction mimetics: the next phase. *Ann NY Acad. Sci.* **1057**, 365-371.

第12章 使用外源性端粒酶延长细胞寿命
Extension of Cell Life Span Using Exogenous Telomerase

Mo K. Kang，No-Hee Park

摘要 正常人体细胞经过有限的细胞分裂周期之后，进入不可逆的复制停滞，称为衰老。许多类型人类细胞的衰老由端粒序列的长度和状况调控，而端粒长度在每轮DNA复制后都会缩短。端粒酶参与端粒DNA再次合成，促进端粒再生。端粒酶是一种核糖核蛋白复合体，主要由端粒逆转录酶基因（*hTERT*）和RNA模板（*hTR*）组成。端粒酶在细胞中的活性主要受*hTERT*基因表达水平限制。因此，可以通过*hTERT*过表达恢复细胞内端粒酶活性，这通常导致细胞复制寿命的延长或永生化。由于端粒缩短不是限制细胞寿命的唯一因素，因此公认的一点是端粒酶复原对细胞寿命的影响依赖于细胞类型。然而与细胞类型无关的一点是，端粒酶活性似乎是细胞永生化所必需的。本章讨论了使用*hTERT*异位表达延长原代人类细胞体外复制寿命的详细方法。

关键词 端粒酶；端粒；*hTERT*；*hTR*；衰老；永生化；癌症

12.1 引言

正常人体细胞经过有限的复制，通过调控的衰老进程进入不可逆的细胞分裂停滞（*1*），细胞衰老是与衰老和癌症相关的生理上的重要事件。据报道，衰老过程中，衰老细胞在原位以及衰老相关病症的组织中积累（**参考文献*2*综述**）。细胞衰老也是一种有效的肿瘤抑制机制，变异细胞克服此机制，发生永生化和致瘤性转化（*3*）。尽管衰老的具体分子机制有待确定，但众所周知的是，端粒长度和状况限制正常细胞的复制（*4*）。端粒是位于染色体两端的侧翼六元重复序列，对维持细胞基因组的稳定至关重要（*5*）。由于末端复制的问题，端粒随着DNA的复制，在催化端粒DNA再次合成的端粒酶（*7*）缺失的情况下逐渐缩短（*6*）。

端粒酶主要由*hTERT*（催化蛋白亚基）和*hTR*（RNA模板）构成，是一种核糖核蛋白复合体。端粒酶活性与*hTERT*表达水平密切相关，仅通过*hTERT*的异位表达就可以在正常人细胞中恢复端粒酶的活性（*8*，*9*），这已经在不同类型的正常人细胞中证实，如人二倍体成纤维细胞（HDF）（*10*）、成肌细胞（*11*）、前脂肪细胞（*12*）、淋巴细胞（*13*）以及角质形成细胞（*14*）。大多数人体细胞中*hTERT*的异位表达显著延长正常复制寿命，而*hTERT*是否导致细胞永生化则与细胞类型相关。例如，*hTERT*的异位表达使HDF永生，而人角质形成细胞的永生化则需要另外抑制p16^{INK4A}/pRb肿

瘤抑制通路（***15***）。*hTERT* 过表达导致 HDF 永生化也会发生在许多细胞死亡或永久性复制停滞的危机阶段（***10***）。此外，*hTERT* 永生化 HDF 的长期培养与 $p16^{INK4A}$ 和 p53 肿瘤抑制基因的改变相关联（***16***），而且细胞表现出表型转化（***17***）。这些结果表明，尽管端粒活性是永生化所必需，端粒缩短和状况改变不是限制人体细胞复制的唯一因素。

本章以 HDF 和正常人角质形成细胞（NHK）为例，详细介绍了使用端粒酶延长正常人细胞复制寿命的方法。特别地，我们将讨论如何从分离的组织中建立原代 HDF 和 NHK 培养、如何通过逆转录病毒介导的 *hTERT* 表达来恢复端粒酶活性、如何记录细胞复制动力学以及如何在体外和体内检测端粒酶活性。

12.2 材料

12.2.1 细胞培养基和试剂

（1）Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）（Invitrogen，Carlsbad，CA），添加 10%胎牛血清（FBS）（HyClone，Ogden，UT）。所有细胞培养基 4℃保存。

（2）角质形成细胞基础培养基（KBM）（Cambrex，East Rutherford，NJ），添加生长因子小型试剂盒（Cambrex）。加入生长因子试剂盒的 KBM 被称为角质形成细胞生长培养基（KGM），需要 4℃保存。−20℃保存生长因子试剂盒。

（3）细胞冻存培养基：含有 50% FBS（HyClone）的正常营养培养基，10%二甲基亚砜（DMSO）（Sigma，St. Louis，MO）。

（4）GP2-293 通用包装细胞株（BD Clonetech，Mountain View，CA）。

（5）pVSV-G 包膜质粒（BD Clonetech）。

（6）磷酸钙转染试剂盒（Invitrogen），包括无菌水，2 mol/L $CaCl_2$，2×HEPES 缓冲液（HBS）（**注释 1**）。

（7）S-基本必需培养基（S-MEM）（Invitrogen），添加 10% FBS（HyClone）。

（8）胰蛋白酶溶液（0.25%）-乙二胺四乙酸（EDTA）（1 mmol/L）溶液，Invitrogen。

（9）1×磷酸盐缓冲液（PBS）：8 g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4，0.24 g KH_2PO_4，溶于 1 L 组织培养级水中。用 HCl 调 pH 至 7.4。将此溶液配成 10×的浓度，稀释 10 倍使用。

（10）Geneticin（遗传霉素）G418 储备液（200 mg/mL），Invitrogen。

（11）Puromycin（嘌呤霉素）（Sigma），1 mg/mL 溶于组织培养级水中。

（12）Hygromycin（潮霉素）（Sigma），10 mg/mL 溶于组织培养级水中。

（13）Collagenase（胶原酶）（type Ⅱ 381 U/mg solid；Sigma）。

（14）Dispase（分散酶）Ⅱ［从 Bacillus polymyxa（多黏芽孢杆菌）中得到的中性蛋白酶；Roche Applied Science，Indianapolis，IN］。建立 NHK 的原代培养需要胶原酶和分散酶Ⅱ（见 12.3.1 节 2. 小节）。胶原酶和分散酶Ⅱ溶液需现用现配。

12.2.2　端粒酶活性检测

（1）TRAPeze® XL 端粒酶检测试剂盒（Chemicon，Temecula，CA）。

（2）*Taq* DNA 聚合酶（Qiagen，Valencia，CA）。

（3）T4 多核苷酸激酶（PNK）（Invitrogen）。

（4）5′-三磷酸腺苷［α-^{32}P］（4500 Ci/mmol；10 mCi/mmol）（MP Biomedicals，Irvine，CA）。放射性材料危险，须小心操作，并按规定处理。

（5）1×TRAP 反应缓冲液（20 mmol/L Tris-HCl，pH 8.3，1.5 mmol/L $MgCl_2$，63 mmol/L KCl，0.005% Tween 20，1 mmol/L EGTA）（Chemicon）。

（6）1×CHAPS 缓冲液 ｛10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，1 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L EGTA，0.5% 3-［(3-cholamidopropyl) -dimethylammonium］-1-propanesulfonate，10%甘油，5 mmol/L β-巯基乙醇，0.1 mmol/L benzamidine（苄脒)｝（Chemicon）。

（7）5×蛋白质检测溶液（Bio-Rad，Hercules，CA）。

（8）12%聚丙烯酰胺凝胶，使用 30%丙烯酰胺/双丙烯酰胺、10%过硫酸铵（APS）和 *N*,*N*,*N*′,*N*′-四甲基乙二胺（TEMED，Bio-Rad）配制。

12.2.3　末端限制性片段长度检测

（1）细胞裂解缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），100 mmol/L EDTA（pH 8.0），0.5% 十二烷基硫酸钠（SDS）。

（2）20×SSPE 转移缓冲液：175.3 g NaCl，27.6 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$，7.4 g EDTA 溶于水中，总体积为 1 L。

（3）蛋白酶（肽链内切酶）K（Sigma），100～500 U/mL 溶于水中。

（4）牛胰腺中提取的不含 DNase 的核糖核酸酶（RNase）A（Sigma），10 mg/mL 溶于水中。为确保酶溶液中 DNase 的去除或失活，可以将一管 RNase 煮 10 min，因为 DNase 不耐热，而 RNase 耐热。

（5）超纯缓冲液饱和苯酚（Invitrogen）。

（6）*Hin*FI 和 *Rsa*I 限制性内切酶（Invitrogen）。

（7）Hybond 尼龙核酸转印膜（Amersham，Piscataway，NJ）。

（8）$(TTAGGG)_4$ 合成寡核苷酸（Integrated DNA technologies，Coralville，IA）。

（9）T4 多核苷酸激酶（PNK）（Invitrogen）。

（10）5′-三磷酸腺苷［α-^{32}P］（4500 Ci/mmol；10 mCi/mmol）（MP Biomedicals）。

（11）杂交缓冲液：0.5 mol/L Na_2HPO_4 pH 7.2，7% SDS，1%牛血清白蛋白（BSA），0.5 mmol/L EDTA。

12.3　方法

使用真核表达载体转染细胞，或使用携带全长 *hTERT* cDNA 的逆转录病毒载体侵

染细胞都可以实现通过 *hTERT* 异位表达的端粒酶复原。逆转录病毒介导的基因转移一般比转染有更加可预见的、同质的转基因表达，尤其是在原代人上皮细胞中。质粒转染的细胞在长期培养后可能丧失转基因的表达（***18***）。因此，为了长期表达转基因，建议使用逆转录病毒载体。本节中讨论建立原代人类细胞（HDF 和 NHK）培养的方法，制备表达 *hTERT* 泛嗜性逆转录病毒载体，用病毒载体侵染细胞，以及体外和体内检测复原端粒酶的活性。

12.3.1　建立 HDF 和 NHK 的原代培养

1. 从组织外植体建立原代 HDF 培养

（1）从供体上切下皮肤或口腔结缔组织，立即将组织样品在不含血清的 DMEM 中彻底洗净以除去杂质，并用精细手术剪剪碎成直径约为 2 mm 的小块。

（2）将切碎的组织置于装有含 10% FBS 的 2 mL DMEM 的 60 mm 培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 的加湿培养箱中。2 天更换 1 次营养培养基。1～2 周之后，在每个组织外植体周围可见复制的 HDF 细胞。

（3）当培养皿 60%～70%铺满时，可以用无菌镊子除去组织外植体，用胰蛋白酶消化细胞，并将细胞转移到新培养皿中，密度约为 2.5×10^3 个细胞/cm^2（每个 100 mm培养皿中有 2×10^5 个细胞），1 周之内就能得到 60%～70%铺满的分散良好的细胞培养。

（4）原代 HDF 细胞接着保存在一系列的传代培养中，记录累积群体倍增（PD）的准确数目（**注释 2**）。

2. 从皮肤或口腔黏膜上皮细胞建立原代 NHK 培养

（1）将切除的组织在含有 25 mg 分散酶Ⅱ和 3 mg 胶原酶的 10 mL S-MEM 溶液中 37℃孵育 90 min 即可将上皮细胞层与下面的结缔组织分离。

（2）酶处理后，使用一对细镊子可以轻松将上皮细胞层与结缔组织分离。

（3）使用显微手术剪将分离的上皮细胞层细细剪碎，剪碎的程度决定了胰酶消化之后获得的上皮细胞的数量。

（4）用 0.25%胰酶处理剪碎的上皮细胞 5 min，用含有 10% FBS 的 S-MEM 终止，得到单细胞悬液。胰酶消化时间限制在 5 min 之内，以避免得到上层基底细胞。另外，胰酶消化 5 min 以上会大大降低细胞活力。

（5）使用 KGM 洗涤 1 次分离的上皮细胞，然后在预涂有胶原的 T25 组织培养瓶中培养（**注释 3**）。NHK 细胞连续保存在 KGM 中，在达到 60%～70%铺满时传代培养。一般来说，原代 NHK 细胞的倍增时间约为 30 h，在衰老之前可以传代 4～5 次（***19***）。接种的细胞数目取决于每次培养的目的，对数生长的 NHK 培养中，以 2.5×10^3 个/cm^2 的细胞密度接种后 4～5 天将达到 60%～70%铺满。对逆转录病毒侵染来说，使用复制活跃的 HDF 或 NHK 原代或传代培养非常重要。

12.3.2 逆转录病毒介导的基因转移实现的*hTERT*异位表达

含有*hTERT* cDNA的质粒（PCI-hTERT，见**参考文献9**）可以从Dr. Robert A. Weinberg的实验室（Whitehead Institute for Biomedical Research，Cambridge，MA）得到。要创建表达*hTERT*的逆转录病毒载体，必须将*hTERT* cDNA亚克隆至逆转录病毒表达质粒中，如pLXSN、pLPCX、pLHCX或pLXRN，这些质粒很容易买到。接着在GP2-293通用包装细胞株（BD Clonetech）中制备*hTERT*逆转录病毒载体，GP2-293细胞株允许辅助包膜质粒产生假型化（**注释4**中讨论了逆转录病毒假型化）。使用逆转录表达质粒（含*hTERT* cDNA）和pVSV-G质粒转染GP2-293细胞。包装细胞在48 h内产生病毒，之后收集病毒，超速离心浓缩（生物安全信息见**注释5**）。

1. 制备逆转录病毒载体

（1）转染前一天向每个100 mm组织培养皿中接种1×10^6～3×10^6个GP2-293包装细胞，第二天应该达到约70%铺满。

（2）向装在尖底离心管中的244 μL组织培养级水中加入总量为20 μg（1 μg/μL）的质粒DNA（15 μg逆转录病毒表达质粒和5 μg pVSV-G）。然后向DNA溶液中加入36 μL 2 mol/L $CaCl_2$，冰上孵育5 min。

（3）将300 μL 2×HBS与DNA-$CaCl_2$溶液逐滴混合，每加入1滴HBS后都将溶液混合均匀。将含有DNA-钙-磷酸盐复合物的溶液置于室温20 min，和10 mL营养培养基共同加在100 mm培养皿上的GP2-293细胞上。

（4）转染6 h，然后更换预热的新鲜培养基。

（5）48 h之后，4℃，50 000 *g*离心含病毒而不含细胞的上层培养物90 min。在500 μL所需的培养基中重悬病毒，立即用于侵染或在液氮中迅速冷冻，并在－80℃条件下长期保存。低滴度病毒疑难解答见**注释6**。

2. 细胞的侵染和选择

（1）侵染前一天，将目标细胞（约3×10^5个）接种在60 mm培养皿上，第二天可以达到50%铺满。

（2）37℃水浴迅速解冻浓缩的病毒，一旦融化立即放在冰上。

（3）从目标细胞培养物中除去培养基，将500 μL浓缩病毒溶液和500 μL含有8 μg/mL聚凝胺的培养基加在细胞上。

（4）侵染2 h，然后更换4 mL预热的新鲜培养基。

（5）48 h后可以根据逆转录病毒表达载体上的药物筛选标记使用需要的抗生素，如嘌呤霉素、G418或潮霉素选择侵染物。药物标记的剂量和疑难解答见**注释7**。

（6）完成选择后，余下的耐药细胞保存在一系列传代培养中，如**注释2**所述记录每一代接种和收集的细胞的准确数量（**注释8**）。

（7）收集的细胞可以长期保存在液氮中。在冻存管中将胰酶消化的细胞（约10^6个）重悬于1 mL细胞冻存培养基（见11.2节）中，置于低温1℃冷冻容器（Nalgene，

Rochester，NY；允许温度逐渐下降）中，－80℃过夜。第二天将冻存管转移至液氮中长期保存。复苏细胞时 37℃迅速融化冷冻的细胞，用正常营养培养基洗涤 1 次，接种在组织培养皿中。

12.3.3 确定端粒酶活性的端粒重复扩增检测

用 *hTERT* 逆转录病毒载体侵染细胞并用药物标记选择细胞后，需要确定端粒酶活性。使用端粒重复扩增法（TRAP）确定端粒酶活性。TRAP 是基于 PCR 的在细胞和组织中快速确定端粒酶活性的方法，具有很高的灵敏度（***20***）。TRAP 检测主要包括两步：端粒酶合成端粒以及 PCR 扩增端粒序列（**图 12.1**）。**参考文献 *20*** 详细介绍了 TRAP 检测：端粒酶结合端粒酶模板，增加 TTAGGG 重复序列的串联，在 PCR 中使用 TS 和 CX 引物组合扩增合成的端粒序列。或者也可以使用市售 TRAPeze XL 端粒酶检测试剂盒（Chemicon）进行 TRAP 测试。对培养的细胞按如下步骤进行 TRAP 测试。

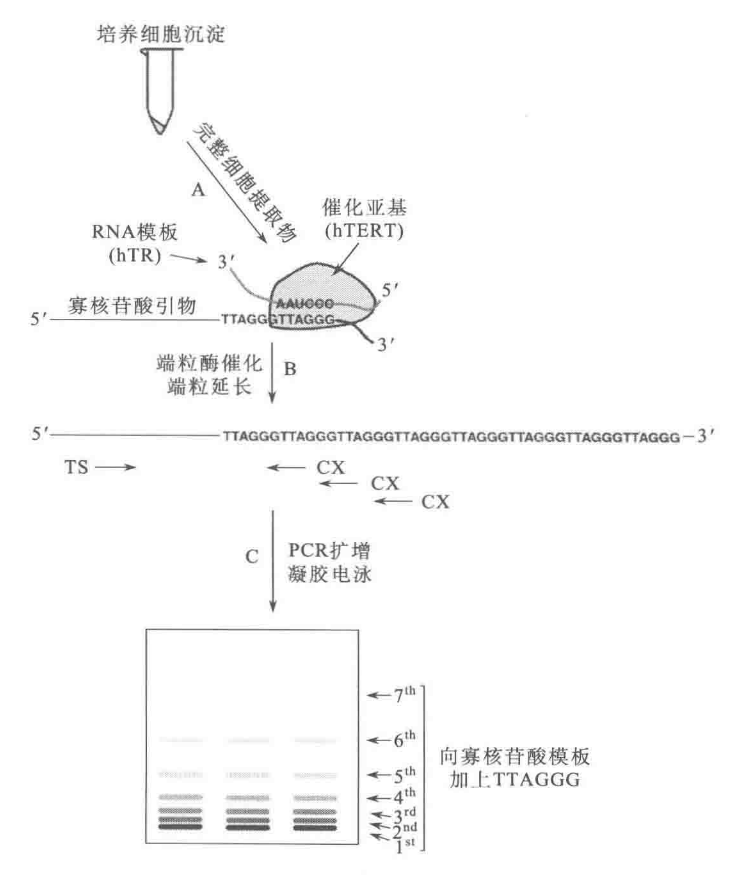


图 12.1 TRAP 检测是基于 PCR 的检测细胞端粒酶活性的方法，主要包括两步：端粒酶再次合成端粒以及 PCR 扩增端粒序列

（A）从在 CHAPS 缓冲液中裂解的细胞培养中得到全细胞提取物（WCE）；（B）将 WCE 与寡核苷酸模板混合，端粒酶与模板结合，增加串联的重复序列，即 TTAGGG；（C）使用 TS 和 CX 引物 PCR 扩增延长的端粒序列和寡核苷酸模板。由于端粒序列的重复，得到的 PCR 产物由彼此相差 6 个碱基对的片段组成

（1）胰酶消化收集细胞，用1×PBS洗涤1次。

（2）将洗涤过的细胞（约50万个）溶于100 μL 1×CHAPS缓冲液中，冰上孵育30 min，12 000 r/min，4℃在微量离心机中离心30 min。

（3）分装上清液，冻存于液氮中供TRAP检测和蛋白质浓度测定。

（4）使用高端粒酶活性的阳性对照细胞（如293细胞）提取物，和200 μg/mL RNase A处理的阴性对照细胞提取物进行TRAP反应。或者可以85℃处理293细胞10 min使其中的酶失活。因为端粒酶活性取决于RNA模板的完整性（***21***）和耐热性（***22***），RNase或加热处理细胞裂解液都可以作为阴性对照。

（5）准备端粒反应混合液：向由1×TRAP反应缓冲液，50 μmol/L每种dNTP，0.05 μg末端标记有α-^{32}P-ATP（4500 Ci/mmol）的TS引物，1 μL引物混合液，0.4 U *Taq* DNA聚合酶的48 μL溶液中加入2 μL含有0.5 μg或2.0 μg细胞蛋白的细胞裂解液（末端标记见**注释9**）。

（6）30℃孵育混合物30 min，端粒酶反应产物在DNA热循环仪（Perkin-Elmer，Foster City，CA）中扩增。以如下条件进行PCR循环：94℃ 30 s，55℃ 30 s进行30个循环，接着72℃ 10 min进行一个延迟延伸周期。潜在的问题见**注释10**。

（7）接着在1×Tris-硼酸EDTA（TBE）缓冲液中使用12%非变性聚丙烯酰胺凝胶30 W电泳120 min分析PCR产物。干胶后，使用X射线放射自显影或磷光显像仪（Amersham）探测放射性信号（**图12.2**）。

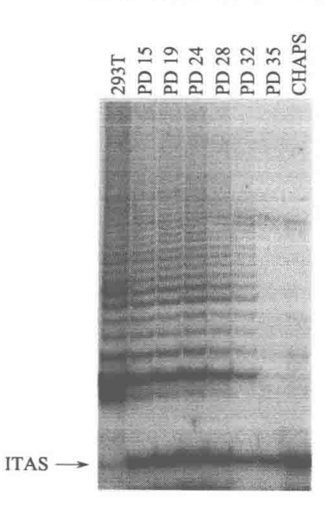


图12.2 使用端粒重复扩增检测（TRAP）法检测细胞裂解液中端粒酶的活性。使用基于PCR的TRAP测定在群体倍增水平不断增加时的正常人角质形成细胞（NHK）（从口腔黏膜获得）的端粒酶活性。每个反应中使用的总细胞裂解液等同于2 μg蛋白质。使用端粒酶阳性人肾上皮细胞系（293）作为阳性对照。随时检测复制的NHK的端粒酶活性直至细胞进入复制衰老（***31***）

12.3.4 Southern印迹法分析端粒长度

在*hTERT*异位表达之后，细胞中的端粒长度明显延长，反映了体内端粒酶的功能复原，细胞中端粒长度的变化可以用下面描述的Southern印迹法确定。

1. 从培养细胞中分离基因组DNA

（1）将2×10^6～5×10^{6}个细胞在500 μL添加了10 μL RNase A（储备液浓度为

10 mg/mL，为 100×的浓度）和蛋白酶 K（终浓度为 100 μg/mL，通常加入 30 μL 浓度为 20 mg/mL 的储备液）中裂解细胞和核蛋白，置于 50℃ 3 h 到过夜。

（2）接着使用 500 μL 缓冲液溶解的饱和苯酚溶液进行苯酚提取。需要使用氯仿和苯酚进行 2 次提取，然后在等体积的异丙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠（pH 5.2）中沉降并分离 DNA。在 75%乙醇中洗涤 1 次后，分离的基因组 DNA 在 10 mmol/L Tris（pH 8.0）中再溶解。2×10^6～5×10^6 个细胞一般能得到 30～50 μg 基因组 DNA。

2. Southern 印迹法以及使用端粒探针杂交

（1）使用 *Hin*F Ⅰ 和 *Rsa* Ⅰ 限制酶完全酶切 10 μg 分离的基因组 DNA，过夜。

（2）DNA 片段在 0.8%琼脂糖凝胶上进行电泳，在 20×SSPE 转移缓冲液中用毛细转移法转移至 Hybond 尼龙膜（Amersham）上。

（3）转移结束后（12～16 h），在 6×SSPE 中简单洗涤膜以除去琼脂糖颗粒，使用 UV 交联仪器（Stratagene，La Jolla，CA）将膜暴露在紫外线下，固定膜上的核酸。

（4）需要进行预杂交来平衡膜并减少非特异性背景信号。通常 65℃在 20 mL 杂交缓冲液中孵育 4 h。

（5）接着使用末端用 PNK 标记有 α-^{32}P-ATP 的（TTAGGG)$_4$ 端粒探针进行杂交（末端标记见**注释 9**）。一般 65℃杂交过夜（12～16 h）。

（6）洗涤滤膜：室温使用 2×SSPE-0.1% SDS，15 min；然后 65℃使用 0.1×SSPE-0.1% SDS，15 min。

（7）使用 X 射线放射自显影或磷光显像仪（Molecular Dynamix）扫描放射性信号（**图 12.3**）。使用磷光信号强度的加权平均确定平均末端限制片段（TRF）长度（**注释 11**）。

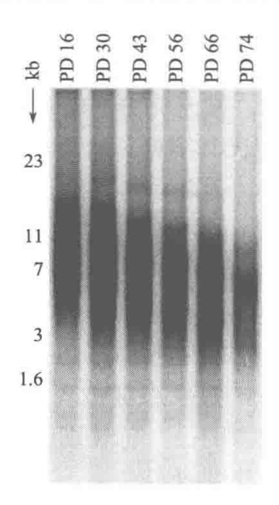


图 12.3　使用 Southern 印迹和端粒探针杂交确定末端限制性片段长度的变化。对一个人二倍体成纤维细胞株进行一系列传代培养直至细胞自发进入衰老期的复制停滞。在不同的种群倍增水平分离细胞的基因组 DNA 并用 *Hin*F Ⅰ 限制酶完全酶切。使用 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离酶切的 DNA 片段并使用毛细转移方法转移至尼龙膜上。端粒信号通过放射性标记的端粒特异性探针捕获（***31***）

12.4　注释

（1）建议以较小的体积分装 2×HBS 溶液，−20℃保存。此溶液的 pH 对于质粒转

染的效率十分重要。

（2）每代细胞的 PD 水平使用式（12.1）计算：

$$\frac{\mathrm{Ln}\left(\frac{N_f}{N_i}\right)}{\mathrm{Ln}2} \tag{12.1}$$

N_f 是给定一代收集的细胞数量，N_i 是这一代初始时接种的细胞数量（***19***）。将累计 PD 相对于培养天数作图以直观表示细胞增殖动力学。

（3）将鼠尾胶原涂在 T25 培养瓶内，使建立原代细胞培养时细胞更好地贴壁。将 2 mL胶原储备溶液（Collaborative Biomedical Products，Bedford，MA；cat. nu. 40236，100 mg/bottle）加入 100 mL 0.02 mol/L 冰醋酸中得到胶原溶液。将培养瓶与 2 mL 胶原溶液 37℃孵育 10 min，然后用 1 mL KGM 洗涤 1 次。

（4）逆转录病毒载体由向包装细胞株中转染含有包装基因的逆转录病毒表达质粒而得到。在这个包装结构中，编码病毒原有的被膜糖蛋白的基因被异源被膜基因所取代（**参考文献 *23*** 综述）。这个过程被称为假型化，有很大实验上的优势，如改变病毒的趋向性和稳定性。被膜核蛋白通过与宿主细胞受体分子间的相互作用在决定病毒趋向性中发挥重要作用。用水泡性口膜炎病毒糖蛋白（VSV-G）使病毒假型化，以此构建宿主细胞范围广泛的泛嗜性病毒，使得病毒能够进入大部分哺乳动物和非哺乳动物细胞（***24***）。此外，VSV-G 假型化病毒的稳定性增强，因此能够超速离心浓缩而不显著影响其侵染性（***25***，***26***）。可以利用 VSV-G 假型化的特点回避低效病毒生产的问题并补救低滴度病毒。

（5）由于其宿主的广泛性，VSV-G 假型化逆转录病毒会带来重大的生物安全问题。现行的美国国家卫生研究院（NIH）制定的生物安全规范建议在生物安全等级（BSL-2 和 BSL-3）下进行使用和操作（http：//www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines _ 02/NIH _ Guidelines _ Apr _ 02.htm）。因为逆转录病毒载体在缺乏完整逆转录病毒基因组的包装细胞株中构建，具有复制能力的逆转录病毒的出现极其罕见。然而，病毒基因组可能整合入宿主细胞染色体，带来插入突变的风险（***27***）。因此，需仔细遵守生物安全委员会机构制定的实验室预防措施。

（6）通常有必要确定病毒的侵染滴度。将病毒在营养培养基中做一系列稀释，并侵染如 12.3.2 节 2. 小节中六孔板上生长的目标细胞。每孔被侵染的细胞数目反映每单位体积中有感染力的病毒颗粒数目，可以通过将病毒感染的培养物暴露在药物选择标记下来确定。病毒的理想滴度取决于特定的实验需要。然而，如果病毒被 VSV-G 假型化（**注释 4**），可以使用超速离心来浓缩低滴度病毒。需要注意的是，包装细胞的转染效率极大影响病毒滴度。因此，要制备高滴度病毒，必须优化转染条件。

（7）一般地，对原代人细胞来说，抗生素的最小致死量为：嘌呤霉素 1 μg/mL，G418 200 μg/mL，潮霉素 10 μg/mL。然而，理想抗生素浓度与细胞类型相关，需要用滴定经验地确定。筛选步骤一般需要 5～7 天，尽管 48 h 内就会明显看出细胞大量死亡。

（8）重要的是要注意外源性端粒酶活性对复制寿命的影响与细胞类型相关。某类细胞中，只表达 *hTERT* 就可以使其永生化，如 HDF（***10***），另一些细胞中只有与其他基

因变异，如抑制 p16^{INK4A}/pRb 通路相结合时才可以（***14***）。此外，即使外源性 *hTERT* 在细胞中表达之后，也可能观察不到复制动力学和寿命表型变化。实验中可以通过过表达“高风险”人乳头瘤状病毒（HPV）的 E7 肿瘤蛋白（***28***）或 CDK4 的突变形式(R24C)（***29***）来抑制 p16^{INK4A}/pRb 通路。

(9) 寡核苷酸的末端标记通常 37℃进行 30 min，反应物 20 μL，包含寡核苷酸引物、1×激酶缓冲液、1 U PNK。标记之后，使用 G25 microspin 柱（Amersham）凝胶排阻过滤除去未结合的核苷酸。对于 TRAP 检测和 TRF 杂交来说，纯化标记的寡核苷酸将产生背景污染较低的清晰信号。

(10) 对于任何基于 PCR 的检测来说，常见问题之一就是 DNA 模板污染，这将造成假阳性结果。因此，最好在实验室中划分出 PCR 扩增使用的区域和仪器，如移液器、微量离心管、移液枪头等。

(11) 为了通过 Southern 印迹法确定平均 TRF 长度，使用 ImageQuant 软件将磷光扫描的凝胶全长分成较小的片段（**图 12.4**）。当全长的胶的上下 20%被切下以提供部分磷光强光强度（PI_i）时，会给出更可靠的读数（**图 12.4**）。接着使用下式计算纹路长度的加权平均从而确定平均 TRF 长度。

$$\frac{\sum PI_i}{\sum \frac{PI_i}{L_i}} \tag{12.2}$$

其中，PI_i 是胶的上下 20%切点长度 i 处的磷光强度；L_i 是相应的限制性片段长度(单位为 kb)（***30***）。

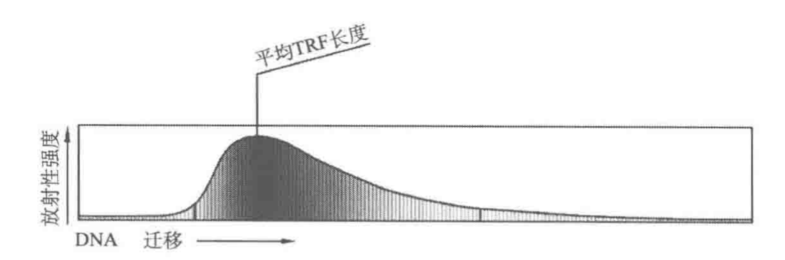


图 12.4　量化端粒长度示意图。Phosphometrically 扫描每个端粒纹路，并沿着它们在电泳凝胶上的迁移描绘其放射性信号。在上下 20%处做出切点，将 phosphometric 扫描在这两点之中分成较小的片段。使用式（12.2）和 ImageQuant 软件确定平均末端限制性片段长度。DNA 片段从左至右迁移（***30***）

致谢

本工作一部分由 National Institute of Dental and Craniofacial Reasearch DE14147 和 DE15316 号拨款支持。

参考文献

1. Hayflick, L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614-636.

2. Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G. P. (2004) Mechnisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* **5**, 1-10.

3. Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522.

4. Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**, 2446-2449.

5. Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999) p53-and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**, 1321-1325.

6. Harley, C. B., Futcher, B., Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.

7. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405-413.

8. Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., et al. (1997) *hEST2*, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**, 785-795.

9. Counter, C. M., Meyerson, M., Eaton, E. N., et al. (1998) Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of *hTERT* (*hEST2*), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* **16**, 1217-1222.

10. MacKenzie, K. L., Franco, S., May, C., Sadelain, M., and Moore, M. A. (2000) Mass cultured human fibroblasts overexpressing *hTERT* encounter a growth crisis following an extended period of proliferation. *Exp. Cell Res.* **259**, 336-350.

11. Di Donna, S., Mamchaoui, K., Cooper, R. N., et al. (2003) Telomerase can extend the proliferative capacity of human myoblasts, but does not lead to their immortalization. *Mol. Cancer Res.* **1**, 643-653.

12. Darimont, C. and Mace, K. (2003) Immortalization of human preadipocytes. *Biochimie* **85**, 1231-1233.

13. Migliaccio, M., Amacker, M., Just, T., et al. (2000) Ectopic human telomerase catalytic subunit expression maintains telomere length but is not sufficient for CD8+T lymphocyte immortalization. *J. Immunol.* **165**, 4978-4984.

14. Dickson, M. A., Hahn, W. C., Ino, Y., et al. (2000) Human keratinocytes that express *hTERT* and also bypass a p16 (INK4a) -enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1436-1447.

15. Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A., Klingelhutz, A. J. (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**, 84-88.

16. Noble, J. R., Zhong, Z. H., Neumann, A. A., Melki, J. R., Clark, S. J., and Reddel, R. R. (2004) Alterations in the p16 (INK4a) and p53 tumor suppressor genes of *hTERT*-immortalized human fibroblasts. *Oncogene* **23**, 3116-3121.

17. Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., et al. (2003) Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer Res.* **63**, 7147-7157.

18. Shin, K. H., Kang, M. K., Dicterow, E., Kameta, A., Baluda, M. A., and Park, N. -H. (2004) Introduction of human telomerase reverse transcriptase to normal human fibroblasts enhances DNA repair capacity. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2551-2560.

19. Kang, M. K., Bibb, C., Baluda, M. A., Rey, O., and Park, N. -H. (2000) In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* **258**, 288-297.

20. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**, 2011-2015.

21. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1987) The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**, 887-898.

22. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43 (2 Pt 1)**, 405-413.

23. Sanders, D. A. (2002) No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 437-442.

24. Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., and Chen, I. S. (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.*, **70**, 2581-2585.

25. Gulizia, J., Dempsey, M. P., Sharova, N., Bukrinsky, M. I., Spitz, L., Goldfarb, D., and Stevenson, M. (1994) Reduced nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes in the presence of a prototypic nuclear targeting signal. *J. Virol.* **68**, 2021-2025.

26. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J. K. (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8033-8037.

27. VandenDriessche, T., Collen, D., and Chuah, M. K. (2003) Biosafety of onco-retroviral vectors. *Curr. Gene Ther.* **3**, 501-515.

28. Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., Howley, P. M. (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **8**, 4099-4105.

29. Rane, S. G., Cosenza, S. C., Mettus, R. V., Reddy, E. P. (2002) Germ line transmission of the Cdk4 (R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 644-656.

30. Kang, M. K., Swee, J., Kim, R. H., Baluda, M. A., and Park, N. -H. (2002) The telomeric length and heterogeneity decrease with age in normal human oral keratinocytes. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 585-592.

31. Kang, M. K., Kameta, A., Shin, K. -H, Baluda, M. A., and Park, N. -H. (2004) Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with loss of telomerase activity and hTERT expression followed by limited telomere shortening. *J. Cell. Physiol.* 199, **264-270.**

第13章 使用确定的遗传因素诱导细胞衰老

Inducing Cellular Senescence Using Defined Genetic Elements

Hiroshi Nakagawa，Oliver G. Opitz

摘要 细胞衰老通常被定义为一个不可逆的 G_1 细胞周期阻滞状态，生长因子刺激难以对其造成影响。几种不同机制可以诱导细胞衰老。原代哺乳动物细胞寿命有限，这表明有一种机制对细胞分裂次数进行计数。这些细胞在一系列增殖之后最终进入一个永久性生长停滞状态，称为复制衰老。端粒 DNA 的减少是复制衰老中的关键因素，细胞永生化时即阻断此过程。然而，除了端粒缩短，还有其他机制诱导与复制衰老表型类似的生长停滞。致癌或促有丝分裂信号以及 DNA 损伤能够诱导细胞衰老表型。所有形式的细胞衰老有着共同的信号通路和形态特征，p53 似乎在衰老响应中至关重要。许多诱导衰老的机制可以通过引入确定遗传因素从实验上说明。例如，端粒缩短引发的复制衰老可以用端粒酶显性负版本来诱导，而早衰可以用致癌基因 *ras* 或 p16 诱导。

关键词 细胞衰老；端粒酶；逆转录病毒基因转移；细胞培养；衰老相关 β-半乳糖苷酶；ras；p16

13.1 引言

近 40 年前，Hayflick 和同事（*1*）报道，原代哺乳动物细胞在组织培养中寿命有限，这表明可能有调控细胞分裂的内在机制。原代细胞培养数代之后增殖潜力可重现性地损失，称为衰老。因此，衰老可能反映了有机体的老化。最近的研究表明，衰老是一个非常庞杂的过程。衰老代表一个复杂的表型，衰老这一术语现已应用于细胞在培养一段时间或选定的癌基因过表达之后任何形式的生长停滞。重要的是，对各类型衰老的多方面分析增加了我们对如衰老和癌变等多细胞过程的理解。由于各种各样的刺激诱导衰老表型，而其中许多刺激有潜在致癌性，因此人们认为，细胞衰老可以阻止细胞增殖和转化。在这种情况下，细胞衰老可能是一种肿瘤抑制机制（**2**）。

证实细胞衰老的第一个例子是复制衰老。复制衰老指有限的复制能力，是大多数正常细胞的定义性特征。复制衰老最初在人成纤维细胞培养中描述（*1*）。随后研究发现，不同物种的各类型细胞都会经历复制衰老。这些研究大部分是利用细胞进行体外培养，也有少数研究支持体内细胞衰老的观点（*3*）。复制衰老由端粒缩短介导，而这在端粒短到足以破坏染色体的完整性之前就会发生。人们很早就了解到端粒，即线性染色体末端的重复 DNA，是防止染色体融合、维持基因组稳定的重要结构（*4*，*5*）。端粒酶增加端粒的重复，端粒酶缺失时，每次细胞分裂伴随 30～150 bp 端粒 DNA 的损失，而严

重的端粒缩短最终诱导正常细胞衰老（*6*）。当细胞获得一个或多个严重缩短的端粒时，就会进入复制衰老（*7*）。此外，端粒酶的异位表达能够阻止一些人体细胞的端粒缩短和复制衰老（*8*）。如今，对端粒缩短在细胞的复制衰老中的作用的深入理解使得我们能够研究它的主要机制。

严重端粒缩短诱导复制衰老，这些导致正常细胞生长停滞和衰老表型的端粒很少受DNA 损伤、染色质重塑以及致癌或有力的促有丝分裂信号等刺激的影响。正常细胞响应癌基因（如激活的 *ras* 或 *raf*）、促有丝分裂信号［如过表达的促分裂原活化蛋白激酶 MAPK（*11*）或 E2F1 转录因子（*12*）］发生不依赖端粒的衰老。不论端粒长短，Ras/Raf/MEK/MAPK 通路的过度激活都会引起早衰。然而，激活 *ras* 诱导的早衰和端粒缩短启动的复制衰老有共同的信号通路和形态特征。在原代人细胞培养中，早衰程序激活 p53 和 p16（*11*），因此这可能是一种肿瘤抑制机制（*9*）。诱导细胞衰老的肿瘤抑制因子包括 p16 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂（CDKI）（*13*）、MDM2 的 p14/ARF 调节剂（*12*）以及早幼粒细胞白血病蛋白（PML）（*14*）。p14/ARF 是 p53 的核心调节剂，是 p53 的肿瘤抑制功能的重要因素（*15*）。因此，p53 在对端粒缩短、DNA 损伤、癌基因以及促有丝分裂信号的衰老响应中至关重要。其他与激活衰老程序相关的条件包括氧化应激与 DNA 损伤。

衰老表型不仅仅是细胞增殖阻滞，细胞衰老的本质特征是不可逆的细胞分裂阻滞。衰老细胞生长停滞发生在细胞周期 G_1 期，生理有丝分裂原并不能刺激其恢复增殖。尽管如此，抑制野生型 p53 可以使衰老细胞从衰老表型中恢复（*16*），与此相反，过表达 *ras* 或 p16 可以强制永生化细胞进入衰老（*17*）。生长停滞的同时，衰老细胞显示出特定的形态和代谢变化，以及分化功能紊乱（*18*～*20*）。许多不同的细胞类型有共同的衰老相关变化，包括细胞变大，溶酶体合成增加，以及 β-半乳糖苷酶［衰老相关 β-半乳糖苷酶（SA-β-gal），最适 pH 为 6.0］的表达（*21*）。

几种不同的机制诱导细胞衰老，这些机制中有许多可以通过引入确定遗传因素从实验上说明。端粒依赖的复制衰老可以在缺乏足够端粒酶活性，复制潜力有限的原代细胞中研究，或者利用不同方法抑制端粒酶。致癌刺激造成的细胞衰老可以由通过逆转录病毒或腺病毒介导的 *ras* 或 p16 过表达诱导，这甚至可以在预先永生化的细胞中实现。无论何种机制诱导的细胞衰老都可以描述为一种细胞仍然存活但基因和蛋白质表达模式改变的停滞状态（*18*，*22*）。

13.2 材料

13.2.1 细胞培养

可以使用不同物种若干类型的原代细胞研究细胞衰老（复制衰老和早衰）。作为例子，这里描述原代人成纤维细胞组织培养的方法，包括两种原代人上皮细胞和鼠胚胎成纤维细胞（MEF）。

（1）在含有 10%胎牛血清（FBS）（Sigma）和 1%青霉素-链霉素的 DMEM（In-

vitrogen）中，37℃，5% CO_2，20% O_2 的条件下培养人成纤维细胞。胰酶消化连续传代培养细胞，120 h 后，使用含 0.1% FBS 的 DMEM 进行血清饥饿处理。用含 10% FBS 的 DMEM 进行血清再刺激。另外，可以在加入 15%铁强化新生小牛血清（HyClone，Inc.）和 10 ng/mL 表皮生长因子（EGF）的 DMEM/F12 培养基中培养原代人成纤维细胞，以获得更好的初始生长条件。

（2）37℃，5% CO_2 在加入 40 μg/mL 牛垂体提取物（BPE；Invitrogen）、1.0 ng/mL rEGF（Invitrogen）、100 μg/mL 链霉素（Sigma）的最终钙浓度为 100 mmol/L 的角质形成细胞-SFM 培养基（KSFM）（Invitrogen）中培养原代人角质形成细胞（如从皮肤、食道、口腔得到；***23～26***）（**注释 1～3**）。为使细胞有更好的生长条件，最初可以一传四传代扩增，并将细胞与丝裂霉素处理的 Swiss 3T3J2 细胞在含有 5%小牛血清（HyClone）、10 ng/mL EGF、0.4 μg/mL 氢化可的松、5 μg/mL 胰岛素、10×10^{-10} mol/L 霍乱毒素（CT）、2×10^{-11} mol/L 三碘甲状腺原氨酸和 1.8×10^{-4} mol/L 腺嘌呤的 DMEM/F12（1∶1，*V/V*）培养基（Invitrogen）中共同培养（***25***）。

（3）人乳腺上皮细胞（HMEC）可以购买得到（Clontech），或如 Stampfer 所述（***27***）从乳房缩小成形术中得到的组织样品中分离。细胞在乳腺上皮细胞培养基（MEGM；Clonetics）中 37℃，5% CO_2 条件下培养（***28***）。MEGM 是由改良 MCDB 170 基础培养基和补充物（EGF、胰岛素、BPE、氢化可的松）组成（***27***）。大多数可用的正常 HMEC 代表超越了凋亡阶段的后选择细胞，可在 MCDB 170 中长期生长。这些细胞能够几乎无限地提供统一批次的正常人上皮细胞，因而在分子和生化研究中特别有用。

（4）**按参考文献 *9*** 所述从野生型 13.5 天胚胎中得到的原代 MEF。在添加 10% FBS（Sigma）和 1% 青霉素 G/链霉素（Sigma）的 DMEM（Invitrogen）中培养 MEF。MEF 在体外是增殖能力强的贴壁细胞。室温下，0.25%胰蛋白酶消化时间应为 3～5 min。

13.2.2 缓冲液

（1）SA-β-Gal 染色液：1 mg/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚 β-半乳糖苷酶（X-gal），5 mmol/L亚铁氰化钾，5 mmol/L 铁氰化钾，1 mmol/L $MgCl_2$，溶于磷酸盐缓冲液（PBS）中，pH 6.0。

（2）Western 印迹 RIPA 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4），150 mmol/L NaCl，1% Nonidet P-40（NP-40），0.1% 十二烷基硫酸钠（SDS），0.1% DOC，1 mmol/L EDTA，2 mmol/L Na_3PO_4，1 mmol/L 苯甲基磺酰氟，Complete Mini 蛋白酶抑制剂混合物（Roche Applied Science）。Western 印迹 TBST 缓冲液：10 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，pH 8.0，0.1% Tween 20。

13.3 方法

13.3.1 原代人、鼠细胞传代

（1）37℃水浴解冻一管早期传代细胞。

（2）准备 DMEM，37℃预热。

（3）向装有细胞沉淀的 15 mL 离心管中加入 8 mL 预热的 DMEM。

（4）800 r/min 离心 5 min 以沉淀细胞（**注释 4**）。

（5）吸弃培养基。

（6）在 10 mL 相应的培养基中重悬细胞沉淀。转移至 10 cm 组织培养皿中，37℃，5% CO_2 孵育。

（7）当细胞 60%铺满（约 3 天），一分三传代细胞（**注释 5**）。

（8）吸弃培养基（倾斜培养皿以保证完全除去培养基）。

（9）用 2×5 mL PBS 洗涤（**注释 6**）。使用移液器将 PBS 滴在培养皿侧面而不是底面，以免冲掉细胞。轻轻旋转培养皿，然后吸去 PBS。重复 1 次。

（10）加入 1 mL 胰蛋白酶/EDTA 溶液，并用 PBS 1∶1 稀释，旋转培养皿使其覆盖细胞。37℃孵育 10～20 min（根据细胞类型确定孵育时间）（**注释 7**）。

（11）镜检细胞，保证完全被胰酶消化。细胞应为圆形并自由浮动。

（12）800 r/min 离心 5 min 以沉淀细胞。

（13）吸去培养基并丢弃。

（14）在 10 mL 相应的培养基中重悬细胞沉淀。转移至 10 cm 组织培养皿中，37℃，5% CO_2 孵育。

（15）每 3～5 天对细胞进行传代。

13.3.2 确定复制寿命

为了分别描述细胞在引入不同遗传因素之前和之后的生长特性，必须分别计算每个细胞类型的复制寿命。因此，亲代和基因变异细胞通常保持在未铺满状态。种群倍增（PD）采用下式确定：PD＝log（N/N_0）/log2，其中 N 是收集到的细胞数量，N_0 是接种细胞数量。使用相差显微镜评价形态变化，对在 5 个高倍视野下（200×）拍摄到的细胞进行计数。

13.3.3 逆转录病毒转导

尽管慢病毒技术的最新进展提供了一个引人注目的选择，在向原代细胞中引入诱导衰老表型的确定遗传因素时，逆转录病毒介导的基因转移仍是首选方法。为了产生复制缺陷型逆转录病毒，在补充 DMEM（Sigma）中培养兼向性或同向性包装细胞系 Phoenix A 或 Phoenix E（Garry P Nolan，Stanford University，www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems）（**图 13.1**），然后用相应的逆转录病毒载体瞬时转染（**注释 8**）以产生兼向性或同向性无复制能力的逆转录病毒。可以使用如 pBabe 载体系统（***29***）、基于 WZL-Hygro 的逆转录病毒载体（Ariad Pharmaceuticals）或 pFBneo 逆转录病毒载体系统（Stratagene）表达感兴趣的基因。例如，致癌 Ras（H-RasV12）用 pBabe-Puro 表达（***9***）。使 pCI-neo-hTERT-HA 发生定点突变，将 710 和 711 位的天冬氨酸和丙氨酸残基分别用缬氨酸和异亮氨酸替代，产生 DN-hTert，随后在逆转录病毒载体中亚克隆（***30***）。另外，可以顺利地使用可诱导的载体系统。转染 48 h 后收集逆转

录病毒上清液并用 0.45 μm 滤膜过滤，用来感染指数生长的细胞（**注释 9**）。感染 48 h 后更换为含有适当抗生素的培养基开始筛选。每组实验中收集多个克隆供进一步研究。感染时，六孔组织培养板每孔接种 1×10^5 个细胞，孵育过夜。每孔中加入 2 mL 新鲜培养基，再加入 0.4 mL 含病毒的培养基，同时含有 4 μg/mL 聚凝胺（Sigma）（**注释 10 和 11**）。一般将感染后第 4 天记为第 0 天。所有的实验都是用空载体感染的细胞作为对照。感染后，用合适的药物［潮霉素（50 μg/mL），G418（200 μg/mL），嘌呤霉素（0.5 μg/mL），杀稻瘟菌素（2.5 μg/mL）或 500 μg/mL zeocin（吉欧霉素）］筛选成功转化的多克隆细胞（**注释 12**）。感染频率通常为 20%～30%。上皮细胞转化的最优条件在这里可以概括为：

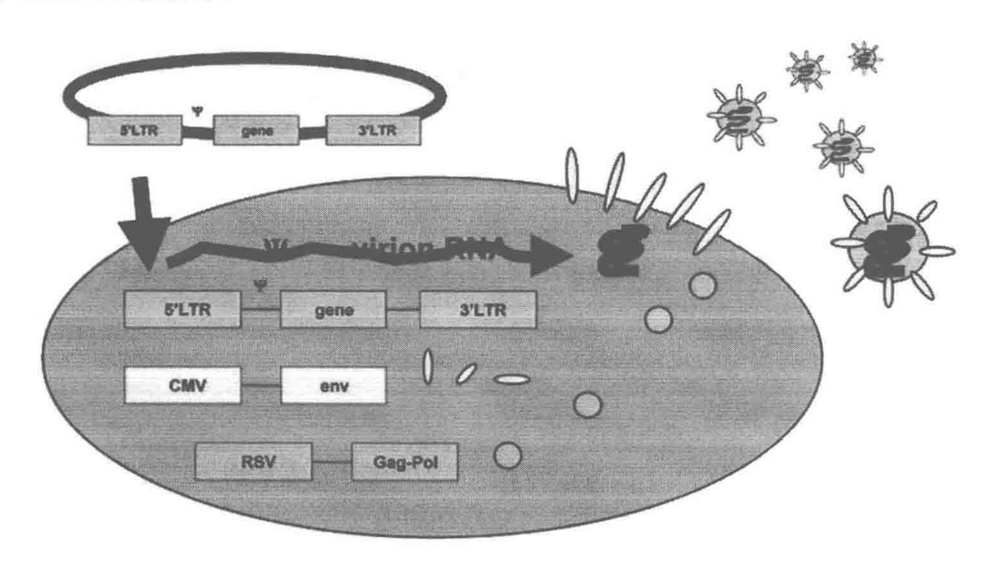


图 13.1　逆转录病毒产生过程示意图。为产生复制缺陷型逆转录病毒上清液，将感兴趣的基因克隆至适当的逆转录病毒载体中，并在包装细胞株中瞬时转染。细胞系已经包含了稳定转染的逆转录病毒 *env*、*gag* 和 *pol* 基因。接着病毒在细胞中产生并被释放到上清液中以感染相应的靶细胞

（1）对人细胞使用兼向性病毒，对小鼠细胞使用同向性病毒。

（2）加入的病毒滴度或培养基体积：对在无血清培养基中生长的原代细胞来说，加入培养基体积的 20%（约 1×10^7 感染性颗粒）。

（3）感染方法：旋转感染（1800 r/min，室温，45～90 min）（可能需要重复）或正常感染。

（4）感染时的细胞密度：约 20%铺满。

（5）聚凝胺浓度：4～8 μg/mL。

13.3.4　腺病毒载体和感染

作为逆转录病毒介导的基因转移的替代，并能确保高滴度病毒上清液，可以如**参考文献 *31*** 描述使用腺病毒感染表达感兴趣基因（如 p16INK4a）。将 p16 cDNA 克隆至穿

梭载体 pAD/CMV 中，与 E3-删除的人腺病毒 dl70001 共同转染至 293 细胞中，使用磷酸钙沉淀。接着用 Southern 印迹法鉴定阳性斑块，纯化 3 次，然后在 293 细胞中增殖。重组病毒随后大规模产生，并使用氯化铯密度梯度离心纯化 2 次。为测定感染效率，相应地准备 Ad5CMV/lacZ（Ad5lacZ）。感染前 24 h 将靶细胞（3×10^5 个）接种在 6 cm 培养皿上。然后加入病毒感染复制数为 100 的腺病毒进行感染。

13.3.5　慢病毒产生和感染

为产生慢病毒，使用 10 μg 转移载体 HIV-CS-CG 或 pLENTI-SUPER、3.5 μg VS-Vg 包被载体 pMD. G、2.5 μg RSV-Rev 和 6.5 μg 包装载体 pCMVDR8.2 通过磷酸钙法转染 293T 细胞（人胚胎肾细胞）（***32***）。转染后 24 h 和 48 h 收集慢病毒，0.45 μm 滤膜过滤。例如，在慢病毒感染 14 天之前，野生型 MEF 细胞经过 9～10 次传代，并每 3～4 天进行一次计数。在 8 μg/mL 聚凝胺的存在下，用慢病毒感染 6 cm 培养皿上的 1.8×10^5 个衰老野生型 MEF 细胞至少 12 h，在为得到生长曲线而进行重新接种之前恢复 48 h（***16***）。

以下段落包括对刻画各种细胞生长特征（细胞周期分析、增殖、衰老、端粒生物学）的步骤的描述。

13.3.6　流式细胞术

在不同的种群倍增（PD）时间收集不同原代和转导细胞，300 *g* 离心 4 min。在 0.5 mL PBS 中重悬细胞沉淀，在 5 mL 70%乙醇中固定，−20℃保存过夜。接着用 PBS 洗涤 2 次，在含有 3.8 mmol/L 枸橼酸钠和 10 μg/mL 碘化丙啶的 1 mL 溶液中重悬。37℃，10 mg/mL RNase 处理 20 min 后，使用流式细胞仪（FACScan；Becton Dickinson）分析样品。

13.3.7　[^{3}H] 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法

在 12 孔组织培养板上接种细胞（每孔 0.25×10^5 个）。逆转录病毒感染之后，每孔中加入 1 Ci [甲基-^{3}H] 胸腺嘧啶脱氧核苷（1 Ci/mL）（Perkin-Elmer）与细胞共同孵育 24 h。用冷的磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次，10%三氯乙酸洗涤 1 次，5%三氯乙酸洗涤 3 次以收集细胞。接着在冰上使用 0.5 mol/L NaOH 裂解细胞 10 min，然后用 0.5 mol/L HCl 中和。向细胞裂解液中加入 10%三氯乙酸，冰上孵育 20 min，然后使用真空取样歧管（Millipore）将其通过玻璃微纤维过滤器（Whatman）过滤。用乙醇润洗过滤器 3 次，80℃干燥 45 min，在 10 mL Ready Value Liquid Scintillation Cocktail（Beckman Coulter）中悬浮并使用 LS 6500 多功能闪烁计数器（Beckman Coulter）以测量放射性。

13.3.8　SA-β-Gal 染色

为确定衰老细胞，进行衰老相关 β-半乳糖苷酶检测，如使用市售衰老相关 β-半乳糖苷酶染色试剂盒（Cell Signaling Technology）。用 PBS 洗涤细胞，在 0.5%戊二醛中固

定，与新鲜 SA-β-Gal 染色液共同在 37℃避光孵育 12 h（**注释 13**）。对早期和晚期传代细胞都进行 5 次独立的染色。接着随机在低倍视野（×10）下对 SA-β-Gal-阳性细胞计数（**图 13.2**），并用相差显微镜下占计数的所有细胞的百分数表示。

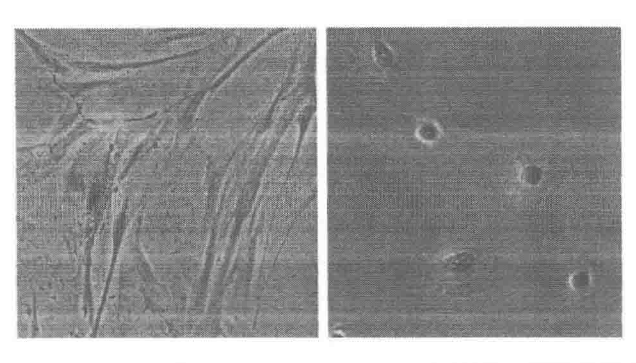


图 13.2 pH 6.0，对诱导衰老的原代人成纤维细胞的β-半乳糖苷酶染色，种群倍增数为 35（左），以及衰老人食管角质形成细胞，种群倍增数为 44（右）

13.3.9 Western 印迹

使用冰冷磷酸盐缓冲液洗涤细胞，并用 RIPA 缓冲液裂解。置于冰上 30 min 后，将细胞裂解液在 4℃，14 000 r/min 离心 15 min 使其澄清。用 BCA 蛋白检测（Pierce Biotechnology）确定蛋白质浓度。蛋白质（10～20 μg）在含有 NuPAGE 还原剂（Invitrogen）的 NuPAGE 十二烷基磺酸锂样品缓冲液中 70℃热变性 10 min。使用 4%～12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分离蛋白质样品，并转移至聚偏氟乙烯膜（Immobilon-P；Millipore）。室温下置于 5%脱脂牛奶（Bio-Rad，溶于 TBST）中 1 h 以封闭膜。将膜与在 1% TBST 牛奶中稀释的相应的一抗 4℃孵育过夜，使膜上标记有一抗探针，再用 TBST 洗涤 3 次，与在 TBST 1∶3000 稀释的抗鼠或抗兔辣根过氧化物酶抗体室温孵育 1 h，接着再用 TBST 洗涤 3 次。用增强化学发光液（ECL Plus；Amersham Pharmacia）使信号可视化，在 Eastman Kodak Co. X-Omat LS 胶片下曝光。使用 Scion Image Beta 4.02 软件对 Western 印迹进行密度测定。使用β-肌动蛋白或β-微管蛋白作为上样对照校准数据（**注释 14**）。

13.3.10 端粒酶活性和端粒长度检测

使用基于 PCR 的端粒酶重复扩增法（TRAP）检测产生的所有细胞的提取物的端粒酶活性（*33*）。因此，在第一步中向细胞提取物中的端粒酶基质寡核苷酸的 3′端增加端粒重复序列。第二步，PCR 扩增延长的产物，生成从 50 个核苷酸起，以 6 个碱基为梯度递增的一系列产物。细胞提取物（50 ng 和 500 ng）与热灭活的对照都用来进行 TRAP 测试。

通常使用 Southern 印迹法测量端粒长度。Southern 印迹法要求提取出来的基因组 DNA 完整并经过纯化。限制性切割端粒 DNA 最常用的酶是 *Hin*f1 和 *Rsa*1。电泳分离

10 μg 这些限制酶酶切基因组 DNA 得到的片段，并与^{32}P 标记的端粒（CCCTAA）探针杂交，使用光密度分析获得末端限制片段（TRF）值。得到的端粒限制片段条带代表了所有染色体的平均端粒长度。为评估单个染色体的端粒长度，可以使用原位荧光杂交（FISH），即定量 FISH。

13.4　注释

（1）培养角质形成细胞时，钙的浓度很重要，因为角质形成细胞对钙诱导的分化敏感。因此，Ca^{2+} 终浓度应维持在 0.4 mmol/L。

（2）添加确定的生长因子（Invitrogen）、1% L-谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素的确定角质形成细胞 SFM（Invitrogen）与普通角质形成细胞 SFM 相比为口腔角质形成细胞提供更好的生长条件。

（3）每次都计算 BPE 的准确浓度，因为每批材料提供的浓度有所不同。

（4）对原代细胞的离心速度不要超过 800 r/min。

（5）原代角质形成细胞对分化很敏感，密度不要超过 30%～40%铺满。

（6）培养原代角质形成细胞中使用不含钙和酶的 PBS 很重要，因为这些细胞对钙敏感。

（7）胰蛋白酶/EDTA 和 PBS 以 1∶1 混合的溶液效率最高，毒性最小。

（8）如果在转染时减少培养基体积，如对 10 cm 培养皿使用 5 mL 培养基，将增加病毒滴度，原因不明。

（9）对一些细胞而言，旋转感染的效果好于单纯孵育的正常感染。

（10）对一些类型的细胞，8 μg/mL 的聚凝胺浓度使得感染效率更高。

（11）逆转录病毒成功转导中的关键因素：病毒滴度或加入培养基的体积，感染方法，简单孵育或旋转感染，感染的细胞浓度，聚凝胺浓度。

（12）需要根据经验选择每种细胞所用的药物。文中提到的浓度为被证实在不同原代培养条件中近似的有效剂量，可以当作起始浓度。

（13）使用新鲜配制的 β-gal 染色液能够显著增强染色。另外，X-gal 在水中不稳定，需要在使用之前加到染色液中。5 mmol/L 亚铁氰化钾和 5 mmol/L 铁氰化钾为生物危险品，应参照 MSDS 妥善处理。

（14）TEMED 最好室温保存在干燥器中。由于 TEMED 在开瓶之后质量可能下降，使得凝胶需要更长时间凝固，购买小瓶装。

参考文献

1. Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621.
2. Linskens, M., Harley, C. B., West, M. D., Campisi, J., and Hayflick, L. (1995) Replicative senescence and cell death. *Science* **267**, 17.
3. Campisi, J. (2000) Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* **14**, 183-188.
4. McClintock, B. (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**, 234-282.

5. Blackburn，E. H. and Chiou，S. S.（1981）Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**，2263-2267.
6. Harley，C. B.，Futcher，A. B.，and Greider，C. W.（1990）Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* **345**，458-460.
7. Levy，M. Z.，Allsopp，R. C.，Futcher，A. B.，Greider，C. W.，and Harley，C. B.（1992）Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**，951-960.
8. Bodnar，A. G.，Ouellette，M.，Frolkis，M.，et al.（1998）Extension of life span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**，349-352.
9. Serrano，M.，Lin，A. W.，McCurrach，M. E.，Beach，D.，and Lowe，S. W.（1997）Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**，593-602.
10. Zhu，J.，Woods，D.，McMahon，M.，and Bishop，J. M.（1998）Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Dev.* **12**，2997-3007.
11. Lin，A. W.，Barradas，M.，Stone，J. C.，van Aelst，L.，Serrano，M.，and Lowe，S. W.（1998）Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**，3008-3019.
12. Dimri，G. P.，Itahana，K.，Acosta，M.，and Campisi，J.（2000）Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14/ARF tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **20**，273-285.
13. McConnell，B. B.，Starborg，M.，Brookes，S.，and Peters，G.（1998）Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* **8**，351.
14. Ferbeyre，G.，de Stanchina，E.，Querido，E.，Baptiste，N.，Prives，C.，and Lowe，S. W.（2000）PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* **14**，2015-2027.
15. Sherr，C. J.（1998）Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* **12**，2984-2991.
16. Dirac，A. M. and Bernards R.（2003）Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J. Biol. Chem.* **278**（**14**），11，731-11，734.
17. Harada，H.，Nakagawa，H.，Oyama，K.，et al.（2003）Telomerase induces immortalization of human esophageal keratinocytes without p16INK4a inactivation. *Mol. Cancer Res.* **1**（**10**），729-738.
18. Linskens，M. H. K.，Feng，J.，Andrews，W. H.，et al.（1995）Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res.* **23**，3244-3251.
19. Sherwood，S. W.，Rush，D.，Ellsworth，J. L.，and Schimke，R. T.（1988）Defining cellular senescence in IMR-90 cells：a flow cytometric analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**，9086-9090.
20. Shelton，D. N.，Chang，E.，Whittier，P. S.，Choi，D.，and Funk，W. D.（1999）Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* **9**，939-945.
21. Dimri，G. P.，Lee，X.，Basile，G.，et al.（1995）A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**，9363-9367.
22. Goldstein，S.（1990）Replicative senescence：the human fibroblast comes of age. *Science* **249**，1129-1133.
23. Rheinwald J. G. and Green H.（1975）Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes：the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**（**3**），331-343.
24. Lindberg，K. and Rheinwald，J. G.（1990）Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differentiation* **45**，230-241.
25. Rheinwald，J. G.，Hahn，W. C.，Ramsey，M. R.，et al.（2002）A two-stage，p16（INK4A）-and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol. Cell Biol.* **22**，5157-5172.
26. Andl，C. D.，Mizushima，T.，Nakagawa，H.，et al.（2003）Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation，migration，and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **278**，1824-1830.

27. Stampfer, M. R. (1985) Isolation and growth of human mammary epithelial cells. J. *Tissue Culture Methods* **9**, 107-115.

28. Foster, S. A. and Galloway, D. A. (1996) Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary epithelial cells. *Oncogene* **12** (**8**), 1773-1779.

29. Morgenstern, J. P. and Land, H. (1990) Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3587-3596.

30. Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., et al. (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* **5**, 1164-1170.

31. Mitra, J., Dai, C. Y., Somasundaram, K., et al. (1999) Induction of p21 (WAF1/CIP1) and inhibition of Cdk2 mediated by the tumor suppressor p16 (INK4a). *Mol. Cell Biol.* **19** (**5**), 3916-3928.

32. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* **72**, 8150-8157

33. Kim, N. W. and Wu, F. (1997) Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res.* **25**, 2595-2597.

第 14 章　氧化应激诱导细胞衰老的方法

Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress

Jian-Hua Chen，Susan E. Ozanne，C. Nicholas Hales

摘要　体外培养的正常人成纤维细胞的增殖潜力有限，在连续传代之后最终进入衰老，即熟知的复制衰老。这暗示了细胞衰老可能是人类衰老的细胞学基础。事实上，在人类和啮齿动物中，具有衰老特征的细胞随着年龄增长逐渐积累，也暗示了细胞衰老的作用。因此，体外细胞衰老被认为是阐明生物体衰老分子机制的一个有用的模型。除了复制衰老，包括氧化应激在内的一系列应激也可以诱导细胞衰老。过氧化氢被广泛用来在较短的时间内实现氧化应激诱导的早衰。这种诱导的早衰细胞显示出很多与复制衰老细胞相同的标志。因此，氧化应激诱导的衰老细胞是体外衰老研究中的优秀工具。

关键词　衰老；氧化应激；H_2O_2；DNA 损伤；双链断裂；SA-β-gal；细胞周期阻滞

14.1　引言

1961 年 Hayflick 和同事首次描述了细胞衰老，他们观察到培养的人二倍体成纤维细胞分裂次数有限（*1*）。随后有人发现，大多数类型原代培养的正常细胞的复制能力最终会耗尽，并进入生长停滞状态，这称为复制衰老（*2*）。复制衰老与端粒缩短相关，而端粒缩短是因为端粒酶缺失下 DNA 末端复制问题（*3*）。衰老细胞进入不可逆的生长停滞，但在一段时间内仍保持存活（*4*）。这些细胞形态发生了巨大变化，细胞体积增大并且形状变得扁平，同时表达衰老相关 β-半乳糖苷酶（SA-β-gal）（*5*）。在分子水平上，衰老与大量基因的表达变化相关（*6*，*7*）。值得注意的是，两个参与细胞周期调控的通路，p53 和 Rb 通路，在复制衰老中起重要的作用（*8*）。

目前很清楚的是，细胞衰老涵盖广泛，而复制衰老仅仅是其中一例。有研究表明，DNA 损伤（*9*～*12*）或破坏异染色质的试剂（*13*）以及强促有丝分裂信号（*14*～*16*）能够在早期传代细胞中诱导早衰表型。氧化应激能够造成 DNA 损伤，通常在数天内即可诱导早衰，并且不伴随明显的端粒缩短（*17*）。然而，轻度氧化应激也会导致端粒依赖型的早衰（*18*，*19*），这是因为轻度氧化应激造成端粒区域单链断裂，从而加速端粒缩短（*20*，*21*）。

氧化应激诱导的细胞衰老一直被视为衰老研究中优秀的体外模型。衰老的自由基理论预测，正常有氧代谢产生的活性氧（ROS）对生物分子造成损害，并最终导致组织功能下降和衰老（*22*）。ROS 是以氧原子为中心的自由基，如超氧阴离子自由基和羟自由

基，以及其他（如过氧化氢和单线态氧）的活性非自由基（*23*）。许多证据支持衰老的自由基理论（*24*），因而衰老中氧化应激的作用也得到了广泛研究（*25*）。多种氧化应激已用来诱导早衰，包括接触过氧化氢（*26*）、紫外光（UV）（*27*）、叔丁基氢过氧化物（*28*）以及高氧（*18*），其中过氧化氢是最常用的诱导剂。这里我们将详细描述使用过氧化氢诱导细胞并检测细胞衰老的方法。

14.2 材料

14.2.1 细胞培养

（1）18 mm×18 mm，1号厚度盖玻片（BDH）：盖玻片在蒸馏去离子水和无水乙醇中各清洗1遍，放在吸水纸上风干，置于洁净玻璃烧杯中，盖上铝箔和高压灭菌胶带，高压灭菌。仅能在无菌条件下打开。

（2）冻存管（NALGENE）。

（3）人成纤维细胞系IMR-90［美国标准菌种收藏所（ATCC）号为CCL-186］。

（4）Modified Eagle's Minimal Essential Medium（EMEM；ATCC），添加10%胎牛血清（FBS；ATCC），100 U/mL青霉素，0.1 mg/mL链霉素（青霉素-链霉素溶液，Invitrogen）。

（5）Dulbecco's磷酸盐缓冲液（PBS）（不含Ca^{2+}和Mg^{2+}，Sigma）。

（6）1×胰蛋白酶-EDTA，溶于PBS（10×胰蛋白酶-EDTA溶液，Invitrogen）。

（7）二甲基亚砜（DMSO；Sigma）。

（8）过氧化氢［30%（*m*/*m*）溶液，Sigma］。

14.2.2 SA-*β*-gal检测

（1）光学显微镜。

（2）PBS：使用Sigma PBS片配制。

（3）0.1 mol/L柠檬酸溶液：2.1 g一水合柠檬酸溶于100 mL蒸馏去离子水中。

（4）0.2 mol/L磷酸钠溶液：2.84 g/100 mL磷酸氢二钠或3.56 g/100 mL二水合磷酸氢二钠。

（5）柠檬酸/磷酸钠缓冲液，pH 5.0或6.0：向50 mL 0.2 mol/L磷酸钠溶液中混合0.1 mol/L柠檬酸溶液直至到达理想pH。

（6）200 mg/mL X-gal溶液：在0.5 mL二甲基甲酰胺（DMF）中溶解100 mg X-gal粉末，−20℃避光保存。

（7）5 mol/L NaCl。

（8）100 mmol/L亚铁氰化钾溶液：2.12 g溶于50 mL蒸馏去离子水。

（9）100 mmol/L铁氰化钾溶液：1.65 g溶于50 mL蒸馏去离子水。

（10）1 mol/L氯化镁溶液：10.17 g溶于50 mL蒸馏去离子水。

（11）SA-*β*-gal染色液（现用现配）：配制20 mL染色液，混合4 mL柠檬酸/磷酸钠缓冲液和100 μL X-gal溶液。然后加入1 mL 100 mmol/L亚铁氰化钾溶液，1 mL

100 mmol/L 铁氰化钾溶液，0.6 mL 5 mol/L NaCl，40 μL 1 mol/L 氯化镁，13.26 mL 蒸馏去离子水。

（12）4%多聚甲醛固定液：在 50 mL 蒸馏去离子水中溶解 4 g 多聚甲醛，加入 1 mL 1 mol/L NaOH 溶液，在电热板（约 65℃）上加热溶液并轻轻搅拌直至多聚甲醛溶解。接着加入 10 mL 10×PBS 并冷却至室温。使用 1 mol/L HCl（大约需要 1 mL）调节 pH 至 7.4，加入蒸馏去离子水至终体积 100 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤溶液除去颗粒物，分装，−20℃保存。

14.2.3 BrdU 掺入法

（1）荧光显微镜，滤光片需适合检测异硫氰酸荧光素（FITC）和 TOTO-3-碘化物。

（2）标记试剂：5-溴-2′-脱氧尿苷（BrdU，SIGMA），5 mg/mL（16.3 mmol/L）。

（3）渗透液：0.2%（*m/V*）Triton X-100（SIGMA），溶于 PBS。

（4）变性液：2 mol/L HCl。

（5）荧光素偶联的鼠单克隆抗 BrdU 抗体（Alexis Biochemicals）。

（6）TOTO-3-碘化物（Molecular Probes）。

14.2.4 免疫荧光法

（1）激光共聚焦显微镜。

（2）10×PBS。

（3）4%多聚甲醛（**副标题 14.2.2**）。

（4）Tris 缓冲液（TBS）：50 mmol/L Tris-HCl（pH7.4），150 mmol/L NaCl。

（5）淬火液：0.1%硼氢化钠，溶于 PBS（当天配制，戴手套和面罩，小心处理）。

（6）0.2% Triton X-100，溶于 PBS。

（7）牛血清白蛋白（BSA）。

（8）封闭液：10%马或羊血清，1% BSA，0.02% NaN_3，1×PBS。

（9）抗体稀释缓冲液：1% BSA，溶于 TBS。

（10）抗 γ-H2A.X 抗体（Upstate）和 53BP1。

（11）二抗：Alexa Fluor® 488 驴抗鼠免疫球蛋白（Ig）G 和 Alexa Fluor 555 羊抗兔 IgG（Molecular Probes）。

（12）封片液：抗荧光衰减（Antifade）封片液（Molecular Probes）。

14.3 方法

市售成纤维细胞在购进之后应当先扩增（群体倍增数 PD≤5）并冻存。本章所述的方法使用了人成纤维 IMR-90 细胞进行优化。如果使用不同细胞株，应进行剂量反应实验以获得不杀死细胞的前提下最有效的过氧化氢浓度，建议滴定的浓度为 50～800 μmol/L。

由于小部分细胞可以从 1 次 H_2O_2 应激中恢复并重新进入细胞周期，增殖并最终在数量上超过诱导早衰的细胞，直至发生接触抑制。2 次 H_2O_2 应激可以在很大程度上避免这种情况（*12*）。以较低密度（细胞可以充分扩大）在平皿上培养时，氧化应激细胞形态逐渐变化。最终的形态特征与复制衰老细胞相同。**图 14.1** 显示了典型的早期传代和复制衰老的 IMR-90 细胞，复制活跃的细胞和衰老细胞能够从形态上区分。除了形态改变，也可以从永久性细胞周期阻滞和 SA-β-gal 活性来检测衰老细胞。衰老研究中，48 h 脉冲标记后 BrdU 没有掺入细胞核 DNA 通常被认为是永久性生长停滞的充分依据，尽管也可以采用更长的 BrdU 标记时间。**图 14.2** 为早期传代 IMR-90 细胞在 pH 5.0 和 pH 6.0 下的 SA-β-gal 染色，以及对 H_2O_2 诱导的早衰细胞在 pH 6.0 的 SA-β-gal 染色。H_2O_2 处理导致永久性的 DNA 双链断裂，可使用识别 DNA 双链断裂标记蛋白（如 γ-H2A.X 和 53BP1）的抗体通过免疫荧光染色来检测（**图 14.3**）。氧化应激导致的永久性 DNA 损伤可能是早衰的原因（*29*）。

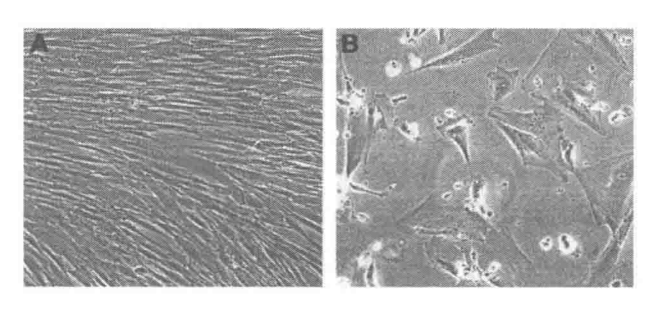


图 14.1　细胞形态

（A）早期传代对照组（PD 30）；（B）复制衰老的人成纤维 IMR-90 细胞

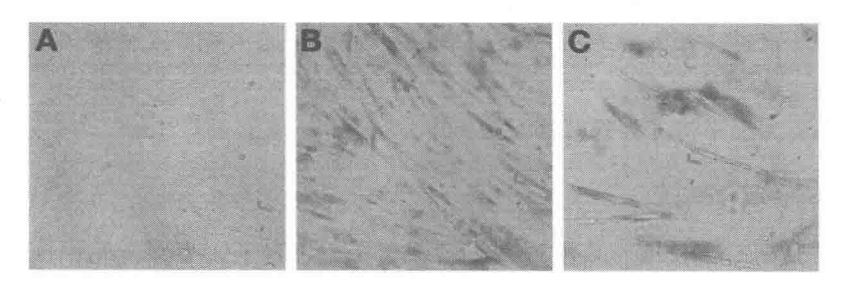


图 14.2　人成纤维 IMR-90 细胞衰老相关的 β-gal 染色

（A）早期传代（PD 30）细胞，pH 6.0 染色；（B）早期传代（PD 30）细胞，pH 5.0 染色；（C）氧化应激诱导的早衰细胞，pH 6.0 染色

也可以通过测量 p53、p21、γ-H2A.X 水平的上升以及视网膜母细胞瘤蛋白（Rb）的低磷酸化来评估氧化应激的作用，都可以使用适当的抗体，通过 Western 印迹法确定。本章没有介绍 Western 印迹法，Chen 等的文章（*12*，*29*）中介绍了氧化应激后这些蛋白质的检测。

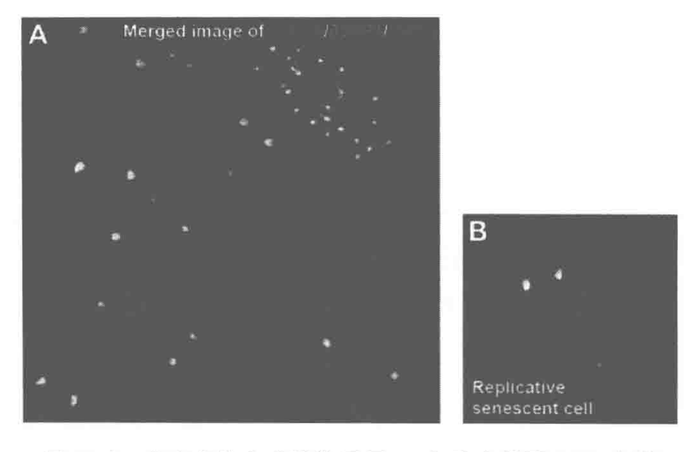


图 14.3　在衰老的人成纤维 IMR-90 细胞中检测 DNA 损伤

(A) H_2O_2 诱导的早衰细胞中 γ-H2A.X 和 53BP1 的合并图像；(B) 复制衰老细胞中 γ-H2A.X 和 53BP1 的合并图像。第二次 H_2O_2 处理后第 8 天时对细胞进行固定和染色

14.3.1　冷冻细胞

(1) 检查培养物，确保其生长状态良好，未受到污染（**注释 1**）。

(2) 培养细胞直至后对数期，胰蛋白酶消化并对细胞进行计数。

(3) 将细胞合并入一个 50 mL 离心管中，160 *g* 离心 2 min。

(4) 向生长培养基中加入 DMSO 配制冷冻培养基，DMSO 终浓度为 5%。

(5) 弃上清液，在冷冻培养基中重悬细胞，细胞浓度约为 1×10^6 个/mL。

(6) 分装至预先标记好的冻存管中，每管 0.5 mL。

(7) 将冻存管放在聚苯乙烯盒子中的纸巾之间，置于−80℃标准冷柜中过夜以慢慢冷冻细胞。

(8) 第二天上午将冻存管转移至液氮中。

14.3.2　解冻细胞

(1) 将 17 mL 生长培养基装在 75 cm^2 培养瓶中，置于 37℃培养箱中预热。

(2) 从液氮中取出冻存管，在两手之间快速融化。

(3) 融化之后，向冻存管上喷洒 70%乙醇，并将管中的物质转移至预热好的培养瓶中。

(4) 第二天上午更换培养基以除去残留的 DMSO。

14.3.3　H_2O_2 处理

(1) 胰酶处理指数增长的细胞并计数，将 1.8×10^6 个细胞重新接种在含有 12 mL 生长培养基的 100 mm 培养皿中（**注释 2**）。

(2) 孵育 24 h，使细胞贴壁。

（3）准备适量 600 μmol/L H_2O_2，溶于生长培养基中（**注释 3**）。

（4）从培养箱中取出培养皿，吸原有的培养基。

（5）每个培养皿中加入 13 mL 600 μmol/L H_2O_2（**注释 4**）。

（6）将细胞放回培养箱中。

（7）2 h 后吸培养基，重新加入不含 H_2O_2 的培养基，孵育 4 天。

（8）以 1∶2 的比例将细胞分盘，孵育 24 h（**注释 5**）。

（9）重复**步骤（3）～（6）**，再次用 H_2O_2 处理细胞。

（10）每天察看细胞的形态变化（**注释 6**）。**图 14.1** 显示早期传代对照组和复制衰老的人成纤维细胞的形态。

14.3.4　BrdU 掺入法

（1）将盖玻片上生长的细胞转移至六孔板中，每孔含有 2 mL 培养基。

（2）加入 BrdU，终浓度为 10 μmol/L。

（3）标记 48 h。

（4）吸去培养基，用 PBS 洗涤细胞 2 次。

（5）吸去 PBS，加入 2 mL 4%多聚甲醛。室温固定 5 min。

（6）用 PBS 洗涤 3 次。

（7）将细胞置于 2 mL 0.2% Triton X-100（溶于 PBS）中使其有渗透性。

（8）用 PBS 洗涤 2 次。

（9）吸去 PBS，加入 2 mL 2 mol/L HCl，室温孵育 1 h，使 DNA 变性。

（10）用 PBS 洗涤 3 次。将第三次洗涤所用的 PBS 留在盖玻片上，同时配制 1∶20 稀释的含 0.5 μmol/L TOTO-3-碘化物的抗 BrdU 溶液（溶于 PBS）。

（11）将盖玻片置于 12 孔板的两孔之间。向盖玻片上加 150 μL 含 0.5 μmol/L TOTO-3-碘化物的抗 BrdU。在加湿暗室中室温孵育 1 h。

（12）用 PBS 洗涤 3 次，再用蒸馏水洗涤 1 次（除去盖玻片上残留的 PBS）。

（13）在荧光显微镜下分析盖玻片。对视野内 TOTO-3-碘化物染色的细胞核总数进行计数（**注释 7**）。

（14）在 FITC 滤镜下观察同样的视野。对视野内阳性细胞计数。

（15）重复**步骤（13）**和**（14）**直到细胞核总数达到 500。

14.3.5　SA-β-gal 检测

（1）用 PBS 洗涤细胞 2 次（**注释 8**）。

（2）室温使用 4%多聚甲醛固定 5 min。延长固定时间会使酶失活。

（3）用 PBS 洗涤细胞 3 次。

（4）加入现配的染色液（六孔板每孔加入 2 mL）。

（5）37℃在加湿暗室中孵育过夜。不要使用 5%～10% CO_2 环境的培养箱（如 CO_2 培养箱）培养细胞。

（6）用光学显微镜检查蓝色染色情况（**注释 9**）。

14.3.6　免疫荧光法分析 DNA 损伤

(1) 根据需要处理细胞。

(2) 用 TBS 洗涤 1 次盖玻片上的细胞。

(3) 室温使用 4%多聚甲醛固定 10 min。

(4) 用 TBS 洗涤盖玻片 1 次。完全吸去 TBS，室温用 2 mL 0.2% Triton X-100 处理 5 min 使细胞具有渗透性。

(5) 室温用 TBS 洗涤盖玻片 3 次，每次 5 min。

(6) 在新鲜 0.1%硼氢化钠（溶于 PBS）中猝灭细胞 5 min。完全吸去猝灭液，用 TBS 洗涤 1 次。

(7) 室温将盖玻片与封闭液共同孵育 1 h。

(8) 用 TBS 洗涤 1 次，5 min。

(9) 用含有 1% BSA 的 TBS 适当稀释一抗（**注释 10**）。

(10) 将盖玻片放在 12 孔板的两孔之间，向盖玻片上加 220 μL 抗体。

(11) 4℃在加湿暗室中孵育过夜。

(12) 用 TBS 洗涤所有盖玻片 3 次，每次 5 min。

(13) 室温在黑暗下将盖玻片与含有 1% BSA 的 TBS 适当稀释的荧光标记的二抗共同孵育 45 min（**注释 11**）。

(14) 避光用 TBS 洗涤盖玻片 3 次，每次 5 min。

(15) 黑暗中风干盖玻片。

(16) 使用 ProLong Antifade 试剂盒将盖玻片制成装片（在载玻片上）（**注释 12**）。黑暗中风干，用指甲油封存样品。样品可以立即使用激光共聚焦显微镜分析，或 4℃黑暗中保存 1 个月。

14.4　注释

(1) 标准培养条件的 20%环境氧浓度对应约 3%的生理氧水平，已经对细胞造成氧化应激。使用 triple gas 培养箱在低于 3%的氧气浓度下培养细胞可以避免这个问题。有大量文献证明，在含氧 3%条件下培养的人成纤维细胞的群体倍增数比标准 20%氧浓度下培养的细胞高出 20%～30%（**参考文献 *30*** 综述）。

(2) 最好使用单细胞悬液以确保精确计数以及再次接种后的均一生长。这可以通过向胰酶处理过的彼此分离的细胞中加入培养基之前，使用移液枪上下吹吸细胞悬液数次来实现，注意避免泡沫。稀释细胞悬液至浓度为 1.5×10^5 个/mL，并接种 12 mL 至 100 mm 培养皿，则每个培养皿中的细胞数目达到 1.8×10^6 个。如果要进行 BrdU 检测或 SA-β-gal 检测，则在接种细胞之前预先将盖玻片放入培养皿中。

(3) 始终准备新鲜的试剂。使用下式作为指导以计算在 X mL 培养基中配制 600 μmol/L H_2O_2 溶液所需的 30% H_2O_2 溶液的量（以微升计）：$(600\times X\times34)/0.3/10^6$。值得注意的是，$H_2O_2$ 的生物活性很大程度上取决于培养基，即含血清的培养基

<不含血清的培养基<缓冲液。本方法的 H_2O_2 处理中使用含 10%FBS 的培养基以消除任何非 H_2O_2 带来的影响。

（4）将含有 H_2O_2 的培养基轻轻并均匀地加在细胞上很重要，应从培养皿的中心到旁边一圈圈地滴加。将全部 13 mL 加在一点会局部杀死细胞。

（5）据**参考文献 *12*** 报道，一次 H_2O_2 处理很难达到 100%细胞周期阻滞并诱导衰老，因为一部分经处理的细胞会从氧化应激中恢复并重新进入细胞周期。因此，有必要将细胞分盘并再次用 H_2O_2 处理。同样，可以将盖玻片放在 BrdU 和 SA-β-gal 检测的培养皿中，在第二次 H_2O_2 处理后取出。

（6）经过处理的细胞会逐渐变大，但只有当密度足够低时细胞才能够伸展，并观察到完全变大的形态。

（7）如果在染色后可以立即进行分析，则通常无需封闭盖玻片。否则应当使用合适的封闭液封闭盖玻片，4℃保存。我们使用 ProLong Antifade 试剂盒（Molecular Probes）。

（8）使用未铺满的细胞培养很重要，因为维持在满层的非衰老细胞可能表现出假阳性染色。

（9）检测中包括一组阳性对照很重要。这由使用柠檬酸/磷酸钠缓冲液将染色液的 pH 调至 5.0 来实现。这种方法能够检测到所有带有内源性 β-半乳糖苷酶的哺乳动物细胞（**图 2**）。

（10）使用抗体之前在冷冻微量离心机 12 000 g 离心 20 min 可以除去块状物质，从而降低背景。首次使用一抗或荧光标记的二抗之前，应进行滴定以确定能够达到最大特异性信号强度，最小背景的稀释倍数。

（11）此步骤中可以包括 DAPI（终浓度 0.1 μg/mL）。另外，也可以将 DAPI 加入封闭液。

（12）按照 Molecular Probes（＃P-7481）的说明，现用现配。向装有 ProLong 抗荧光猝灭试剂的管中加入 1 mL ProLong 封闭液，轻轻混合。未使用的混合物可以－20℃保存 1 个月。

致谢

感谢 Dr. Thanos D. Halazonetis 慷慨提供抗-53BP1 抗体。本工作一部分由欧洲联盟、Parthenon 基金、NIH、Wellcome 基金支持。

参 考 文 献

1. Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* **25**, 585-621.
2. Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., and Tresini, M. (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 827-848.
3. Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
4. Matsumura, T., Zerrudo, Z., and Hayflick, L. (1979) Senescent human diploid cells in culture: survival,

DNA synthesis and morphology. *J. Gerontol.* **34**, 328-334.

5. Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9363-9367.
6. Dierick, J. F., Kalume, D. E., Wenders, F., et al. (2002) Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett.* **531**, 499-504.
7. Krtolica, A. and Campisi, J. (2002) Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1401-1414.
8. Campisi, J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513-522.
9. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540-2551.
10. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J., and Ames, B. N. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4337-4341.
11. Robles, S. J. and Adami, G. R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to $p16^{INK4a}$ enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**, 1113-1123.
12. Chen, J. H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S. E., Williams, G. H., and Hales, C. N. (2004) Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279**, 49, 439-49, 446.
13. Ogryzko, V. V., Hirai, T. H., Russanova, V. R., Barbie, D. A., and Howard, B. H. (1996) Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell Biol.* **16**, 5210-5218.
14. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and $p16^{INK4a}$. *Cell* **88**, 593-602.
15. Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J. M. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12**, 2997-3007.
16. Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000) Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14 (ARF) tumor suppressor. *Mol. Cell Biol.* **20**, 273-285.
17. Ben-Porath, I. and Weinberg, R. A. (2004) When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* **113**, 8-13.
18. von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* **220**, 186-193.
19. Duan, J., Duan, J., Zhang, Z., and Tong, T. (2005) Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H_2O_2 involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1407-1420.
20. von Zglinicki, T., Pilger, R., and Sitte, N. (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 64-74.
21. von Zglinicki, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem. Sci. 27, 339-344.
22. Harman, D. (2001) Aging: overview. *Ann. NY Acad. Sci.* **928**, 1-21.
23. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
24. Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547-581.
25. Bokov, A., Chaudhuri, A., and Richardson, A. (2004) The role of oxidative damage and stress in aging. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 811-826.
26. Chen, Q. and Ames, B. N. (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 4130-4134.

27. Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K., and Albiez, M. (1989) Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Exp. Cell Res.* **180**, 84-93.

28. Toussaint, O., Houbion, A., and Remacle, J. (1992) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 65-83.

29. Chen, J. H., Ozanne, S. E., and Hales, C. N. (2005) Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. *DNA Repair* (Amst) **4**, 1140-1148.

30. Campisi, J. (2001) From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp. Gerontol.* **36**, 607-618.

第15章　衰老研究中的核移植方法
Nuclear Transfer Methods to Study Aging

Lin Liu，David L. Keefe

摘要　母体年龄影响卵母细胞质量和早期胚胎发育。老年雌性卵母细胞减数分裂异常和早期胚胎发育损伤可能源于细胞核或细胞质，或二者兼有。过去数十年中，核移植作为研究早期胚胎核质相互作用的工具，发现了基因组印记、核重编程，并产生了动物克隆。这里我们介绍研究雌性生殖年龄变化中卵母细胞和受精卵的核质相互作用的技术。只要注意减少其对卵母细胞或胚胎的损伤，核移植就可以有效地进行，而且这一技术本身对减数分裂和早期胚胎发育的影响很小。本章首先探讨使用核移植技术研究在生发泡（GV）阶段衰老相关的卵母细胞减数分裂缺陷的细胞核与细胞质来源，接着在受精卵阶段用核移植研究早期发育中细胞核和细胞质的异常与凋亡。

关键词　核移植；衰老；卵母细胞；胚胎；生殖

15.1　引言

减数分裂的独特性在于两个连续的分裂中期之间没有产生配子（卵子或精子）的间期。减数第一次分裂（MⅠ）时，同源染色体分离，姐妹染色单体仍然互相结合，并向一个纺锤体极移动，导致减数分裂，随后在哺乳动物卵母细胞减数第二次分裂（MⅡ）中期再次停滞，直到受精。为确保染色体均分，MⅠ中的每个同源染色体和MⅡ中每个姐妹染色单体都必须在纺锤体中期板上妥善排列。在青春期，促性腺激素刺激卵泡发育并诱导卵丘细胞群中有能力的卵母细胞恢复减数分裂，生发泡破裂（GVBD）并进入MⅡ期，带有减半的基因组 DNA 的极体受到挤压。MⅡ期卵母细胞受精后成为受精卵，启动哺乳动物胚胎发育（**图15.1**）。

生育能力随年龄下降的现象在女性及很多其他长寿物种的雌性中普遍存在（*1*）。中老年女性捐赠卵子的成功率也很高，这表明卵母细胞质量下降是女性生育能力随年龄增长而下降的主要原因（*2*）。此外，老年女性卵母细胞中染色体的排列以及有丝分裂纺锤体的结构发生显著变化，从而导致非整倍体的高患病率（*3*～*5*）。

大部分与母体年龄相关的非整倍体被认为源于减数第一次分裂时期染色体不分离以及减数分裂错误（*5*～*7*）。延长的减数第一次分裂前期停滞中，随着母体年龄增加而减少的染色体交叉和染色单体之间的结合也可能导致染色单体过早分离，从而造成非整倍体（*4*，*8*，*9*）。一些证据表明，染色体，而非纺锤体，在减数第一次分裂时调控纺锤体的形成并指导适当的纺锤体行为（**参考文献 *10* 综述**）。另一些证据表明，染色体不

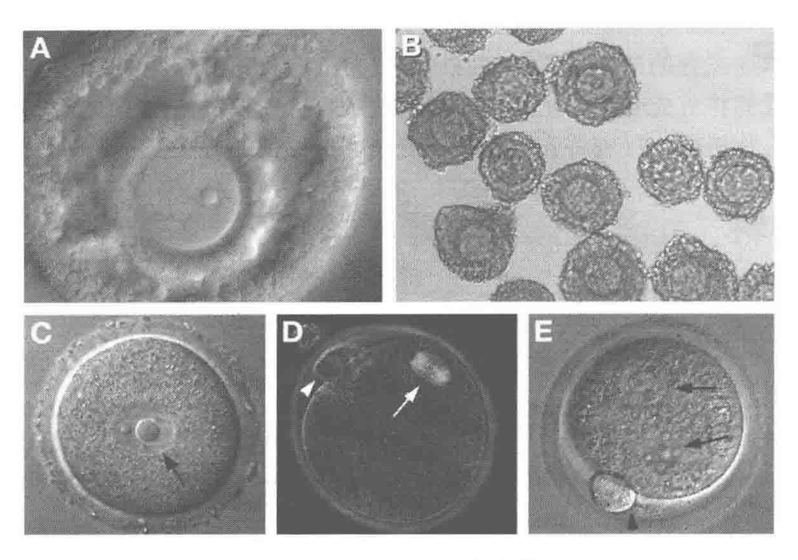


图 15.1　减数分裂各阶段

（A）中间含有卵丘卵母细胞复合物（COC）的囊状卵泡；（B）从囊状卵泡中分离出的一组生发泡（GV）期的 COC；（C）剥离下来的 GV（箭头处）卵母细胞；（D）Pol-Scope 成像显示的 MⅡ期成熟卵母细胞（***35***），箭头处为双折射主轴，箭头指向极体；（E）成熟 MⅡ期卵母细胞受精形成的受精卵显示出两个生殖核（箭头处）。箭头指向极体

分离和减数分裂错误由细胞质产生。此外，母体年龄不仅影响减数分裂，也影响早期胚胎发育（***11***）。

细胞质功能失调，特别是线粒体功能障碍和线粒体 DNA（mtDNA）突变，可能增加自由基的产生并降低 ATP 水平，反过来，这会影响染色体分离以及纺锤体组装。线粒体功能障碍与唐氏综合征的发病机制和病因有关（***12***），动物研究也支持线粒体和 mtDNA 在减数分裂中的作用（***13***）。

目前尚不清楚衰老究竟如何导致染色体不分离和减数分裂错误（***14***，***15***）。一直以来，这一领域都缺乏卵母细胞老化的啮齿动物模型，阻碍了研究进展。衰老加速小鼠（SAM）的生殖衰老与人类女性类似，如出现中期染色体错位，纺锤体破坏频率显著增加（***16***）。使用生发泡（GV）核移植，我们和其他研究人员发现，细胞核或核相关的缺陷似乎是生殖衰老中中期染色体错位和减数分裂异常的一个主要因素（***17***，***18***）。核型分析和发育研究表明，GV 核移植本身并不影响正常减数分裂进程（***19～21***），以及减数分裂成熟后的纺锤体结构和染色体排列（***17***）。核移植中细胞质线粒体的转移微乎其微，因此可以使用该技术合理评价生殖衰老减数分裂异常中的细胞质与细胞核因素。这些研究中获得的知识直接有助于了解并治疗人类衰老相关卵母细胞不孕症。

核移植已用来细致地研究凋亡中细胞核与细胞质的作用（***22***）。小鼠受精卵中，凋亡潜力确实可以通过细胞质转移，很可能是通过线粒体在介导细胞周期停滞和细胞凋亡中起到的核心作用（***22***）。此外，核移植使基因组免于端粒功能障碍，并通过与含有功能性线粒体的细胞质重构而促进细胞存活，这表明在凋亡初期，健康的细胞质能够拯救

细胞核（**23**）。对细胞质在发育调控和重构受精卵死亡过程中功能的研究提供了一个模型，用来在早期发育的凋亡中研究细胞质这一包含线粒体的细胞区室。

本章中我们将首先介绍GV期的核移植技术，这一技术被用来了解衰老相关的减数分裂缺陷的生物机制，接着将介绍原核期受精卵核移植的方法。

15.2 材料

15.2.1 生发泡核移植

1. 试剂

（1）孕马血清促性腺激素（PMSG）（367222，Calbiochem）。

（2）最低基础培养基（minimum essential medium，MEM），含Earle's盐和L-谷氨酰胺（11095-080，Gibco，Invitrogen Corporation）。

（3）细胞松弛素D（C-8273，Sigma）。剧毒。

（4）肌醇（I-7508，Sigma）。

（5）二甲基亚砜（DMSO）（D-2650，Sigma）。

（6）轻质矿物油（M-8410，Sigma）。

2. 准备培养基

（1）剥离的小鼠卵母细胞使用的体外成熟（IVM）培养基：添加0.24 mmol/L丙酮酸盐（丙酮酸钠，P-4562，Sigma）和5%胎牛血清（FBS，热灭活，F-7678，Sigma）的MEM，使用0.22 μm滤膜过滤以灭菌。可以配制240 mmol/L（1000×）的丙酮酸盐储备液，分装并在−20℃条件下保存。

（2）GV移植显微操纵培养基：用25 mmol/L HEPES（H-0763，Sigma）配制的IVM培养基，加入50 μg/mL 3-异丁基-L-甲基黄嘌呤（IBMX，I-7018，Sigma）和2 μg/mL细胞松弛素D，使用0.22 μm滤膜过滤以灭菌。可以使用DMSO配制50 mg/mL（1000×）的IBMX储备液，分装并在−20℃条件下保存。可以使用DMSO配制1 μg/μL的细胞松弛素D储备液，分装并在−20℃条件下保存（**注释1**）。

（3）电融合液：0.28 mol/L甘露醇（M-9647，Sigma），0.1 mmol/L $CaCl_2$（C-7902，Sigma），0.1 mmol/L $MgSO_4$（M-2393，Sigma），以及5 mmol/L组氨酸（或0.025% BSA），溶于去离子水中，使用0.22 μm滤膜过滤灭菌。

3. 仪器与工具

（1）Normarski光学干涉倒置显微镜，Axiovert 100TV，Zeiss（**注释2**）。

（2）两个显微操纵器，Narishige，Japan（**注释3**）。

（3）两个用于抽气或正压力的微量注射器，Narishige，Japan。注射器、连接塑料管、装有Fluorinert FC-40（Sigma）的固定器，通路中不能有气泡。

（4）显微拉制仪，MF-9，Narishige，Japan。

（5）移液器拉拔器，Sutter P-97（Sutter Instruments，Novato，CA）。

（6）微粉碎机，EG-44，Narishige，Japan。

（7）硼硅酸盐玻璃毛细管（Warner Instrument Corp），长度 10 cm。标准型：外径 1.0 mm；内径 0.58 mm。细型：外径 1.0 mm，内径 0.78 mm。

（8）操纵室，向长薄（25 mm×55 mm×1 mm）盖玻片上面粘上一个玻璃框（使用无毒玻璃胶）制作一个简单的小室，允许最大光线透过。向小室中的盖玻片上滴入液滴（10～50 μL 操纵培养基，平整度合适以避免光反射），并覆盖矿物油避免蒸发。

（9）解剖立体显微镜，SMZ-1B 或 2B，Nikon，Japan。

（10）CO_2 培养箱，Model 3130，Forma Scientific，Inc.，USA。

（11）BTX 2001 Electro Cell Manipulator®，Genetronics，Inc.，San Diego，CA。

（12）酒精灯。

（13）两副 Watchman 钳。

（14）一副手术钳，一副小弯钳。

（15）一副手术剪，一副小弯剪。

（16）30 个带有 1 mL 一次性注射器的计量注射针。

（17）35 mm 培养皿（351008，Falcon）。

（18）60 mm 培养皿（351007，Falcon）。

（19）热拉转移吸管，开口处直径 100～120 μm。

（20）70%乙醇。

4. 准备显微工具

（1）手持移液器。将毛细管（外径 1 mm）置于大小合适的火焰上，用双手扭转拉伸至外径为 50～100 μm。用金刚石笔在手指托着的洁净 Kimwipe 上流畅划出 1～1.5 cm的轴，稍微弯曲以创造一个干净的平面切割。使用显微拉制仪在铂丝融化的玻璃微珠上以 45°磨光尖端，使其内径为 15～20 μm。重新定位该吸管，用加热丝使轴弯曲 10°～15°。在移液器上标记弯曲的一侧，以便将移液器安装在吸管架上（**注释 4**）。

（2）针。针由厚壁玻璃毛细管制成。将毛细管安全置于吸管拉拔器加热元件的中央。选择拉拔器的设定，使针尖锐利，针轴坚固。如果不满意，可以使用显微拉制仪对针进行修改。

（3）钝头核移植吸管。使用硼硅酸盐玻璃毛细管（外径 1.0 mm，内径 0.78 mm）制作核移植/摘除吸管。使用水平吸管拉拔器拉伸，调节加热和拉伸强度、速度、时间以得到少于 0.5 mm 长的 15～30 μm 的轴。为制作该工具，我们使用×10 物镜的 Narishige显微拉制仪和直径 0.2 mm 铂丝。V 形丝水平安装在显微拉制仪上，细丝末端与一个小玻璃珠融合。接触微微加热的细铂丝（0.1 mm 或 0.2 mm）上的玻璃珠以得到外径为 15～20 μm 的均匀断裂的尖端，立即使用显微拉制仪关闭加热。加热的瞬间停止使玻璃收缩，尖端断裂。在铂丝上的融化玻璃珠上略微抛光尖端，但不影响尖端的开口，使尖端光滑，避免在显微操纵时对卵子造成损伤。

（4）斜角核移植吸管。首先，与钝头吸管类似，在拉伸之后使用显微拉制仪制作外

径为 15～20 μm 的均匀破裂尖端。设定吸管拉拔器，使薄壁毛细管肩部到尖端有 10～15 mm 的轴。外径约为 20 μm 的吸管在尖端处与玻璃珠轻微融合，迅速关闭加热，细丝与玻璃的收缩使尖端在显微拉制仪上平整地断裂，并不造成尖端变窄。在显微拉制仪上断裂时，保证吸管不弯曲很重要。接着将吸管连贴在高速微粉碎机上，与砂轮呈45°，吸管尖端将呈斜角。向砂轮上注入无菌蒸馏水以清理玻璃屑（**注释 5 和图 15.2**）。

需使用显微拉制仪将吸管头部磨尖使其能够穿过卵透明带。将吸管放回显微拉制仪，将斜面靠近玻璃珠，略微加热，将边缘磨光滑。吸管尖端触及低加热细丝上的小玻璃珠并略微与其融合，接着迅速将吸管与玻璃珠拉开，形成短而锐利的尖端。需注意避免管口变窄。长而锐利的尖端会伤害细胞膜，导致卵母细胞或胚胎发生裂解。因此，不拉长尖端很重要。最后，加热细丝上的吸管轴向斜面尖端一侧弯曲 10°～15°。这将确保在安装到吸管架上之后仍能在显微镜下看到斜面尖端，方便显微操作（**图 15.2A**）。为了应对黏稠细胞质的情况，可以使用 Sigmacot（Sigma）硅化吸管尖端，再用无菌蒸馏水洗涤、干燥，保存在密封容器中（**注释 6**）。

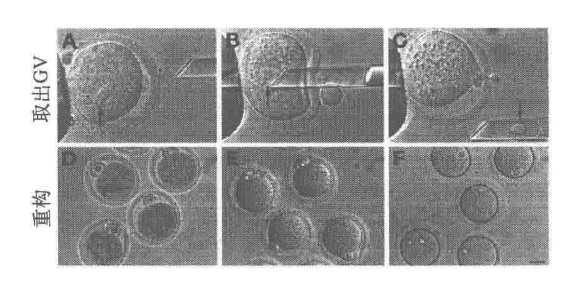


图 15.2 通过显微操作和融合进行生发泡（GV）移植

（A～C）取出 GV；（A）夹持吸管吸取的 GV 卵母细胞；（B）插入斜面吸管，靠近 GV；（C）使用斜面吸管取出供体卵母细胞的 GV。箭头指 GV；（D～F）GV 卵母细胞的重构；（D）将一个 GV 与去除 GV 的受体卵母细胞紧密接触；（E）融合 30 min；（F）融合后 1 h；GV 同受体细胞质重构。标尺＝25 μm

15.2.2 原核移植

1. 试剂和溶液

此处省略部分与 15.2.1 节中相似的试剂。

（1）绒毛膜促性腺激素（hCG）（CG-10，Sigma）。

（2）PMSG（367222，Calbiochem）。

（3）透明质酸酶（H-6254，Sigma）。

（4）准备钾单纯型优化培养基（KSOM）与使用 HEPES 缓冲液（14 mmol/L）配制的 KSOM（HKSOM），分别用来培养胚胎以及体外操作（**表 15.1**）。

（5）显微操作培养基：使用 HEPES 缓冲液（14 mmol/L）配制的 KSOM（HKSOM），添加 2 μg/mL 细胞松弛素 D 和 2 μg/mL 诺考达唑（Sigma）。使用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌。使用 DMSO 配制 1 μg/μL 诺考达唑储备液（剧毒!），分装，－20℃保存。

（6）融合液：0.28 mol/L 甘露醇，添加 0.1 mmol/L $CaCl_2$ 和 $MgSO_4$、5 mmol/L-组氨酸（或 0.025% BSA）。使用 0.22 μm 滤膜过滤灭菌。

表 15.1　小鼠胚胎培养基（KSOM）和操纵培养基（HKSOM）

组分	KSOM 储备液 10×/(mg/100 mL DH_2O)	
NaCl	5550.00	
KCl	186.00	
KH_2PO_4	47.60	
$MgSO_4$	24.10	
(或 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	49.30	
EDTA	3.00	
D-葡萄糖	36.00	
丙酮酸钠	22.00	
乳酸钠	1.86 mL	
L-谷氨酰胺	73.10	
酚红	4.50	
分装，每管 10～11 mL	－20℃保存	未灭菌
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（储备液 1000×）	1.255 g/5 mL DH_2O	4℃保存
工作液	HKSOM（50 mL）	KSOM（50 mL）
$NaHCO_3$	0.01745 g（4 mmol/L）	0.015 g（25 mmol/L）
HEPES	0.1668 g（14 mmol/L）	0.033 g（2.5 mmol/L）
溶于 DH_2O（Sigma）中	44 mL	44.25 mL
BSA	0.050 g	0.050 g
KSOM 储备液 10×	5 mL	5 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$（储备液 1000×）	50 μL	50 μL
NEAA（100×，Sigma）	0.5 mL	0.5 mL
MEM AAS（50×，Sigma）	0.5 mL	0.5 mL
抗生素（100×，Gibco）	0.25 mL	0.25 mL
NaOH（1 mol/L）	0.24～0.25 mL（pH7.2）	
0.4 g NaOH 溶于 10 mL 水中（1 mol/L）		
0.22 μm 滤膜过滤除菌，4℃保存		
有效期 1 个月		

注：抗生素和抗霉菌素（Gibco，cat. no. 15240-096）；MEM 氨基酸溶液（50×）100 mL（Sigma，cat no. M5550），4℃保存；MEM 非必需氨基酸溶液（NEAA；100×）100 mL（Sigma，cat. no. M7145），4℃保存；HEPES 100 g（Sigma，cat. no. H-6147），丙酮酸钠 5 g（Sigma，cat. no. P-8574），乳酸钠，100 mL（Sigma，cat. no. L-7900），BSA（Sigma，cat. no. A-3059-10g）。

2. 仪器和显微工具

与 15.2.1 节中的描述基本相同。

15.3　方法

15.3.1　生发泡核移植

（1）收集 GV 卵母细胞以及裸露卵母细胞的 IVM。主要按照之前描述的步骤分离

和培养未成熟的卵母细胞（***24***）。收集卵母细胞之前 44～46 h，向雌性小鼠单次注射 5 IU PMSG，颈椎脱臼法人道地处死小鼠（***25***）。70％乙醇消毒腹部区域。剪开皮肤及腹膜使腹腔暴露。摘除卵巢，使用 30-规格的针在 35 mm 培养皿中的 2～3 mL 预先平衡的 IVM 培养基中外周穿刺带有囊状卵泡，卵丘 GV-卵母细胞复合物被释放、收集、并用 IVM 培养基小滴洗涤 3～4 次。反复轻柔吹打，从卵母细胞中机械地除去卵丘细胞以方便显微操作。用来剥离卵丘细胞的吸管内径约为 80 μm。需要注意防止吹吸时可能发生的卵母细胞裂解。洗涤 10～20 个 GV 期卵母细胞，37℃，7％ CO_2 的湿润环境下，在矿物油下的 100 μL IVM 培养基微滴中培养细胞 15～16 h 使其体外成熟（**注释 7**）。实验中排除从卵泡中释放的无卵丘细胞层的裸露卵母细胞。所有的体外操作都在 36～37℃加热台或加热室中进行。

（2）**图 15.2** 和**图 15.3** 描述了 GV 核移植。显微操作之前 20 min 时，在显微操作培养基中室温孵育 GV 卵母细胞。

（3）GV 可以通过两种方法除去：使用尖锐斜角微量吸管（**图 15.2**；**注释 8**）或用针切割透明带（或透明带穿孔），然后用钝头核移植吸管吸出 GV（**图 15.3**）。不用针的话，也可以使用压电吸管驱动和钝头吸管完成 GV 移植。

（4）夹住卵母细胞并旋转使透明带下的卵黄周隙清晰可见。接着使用显微针头与插入卵黄周隙的夹持吸管相对，成切线地穿过透明带进入卵黄周隙。推进针头，在透明带上产生另一个洞，并从卵黄周隙中穿出去，而显微针头坚固的轴区域留在分离的透明带中。两个洞之间的距离直径为 20～30 μm（**图 15.3A**）。

（5）温和施加压力使夹持吸管同卵母细胞分离；卵母细胞仍然附着在微针上。使用摇杆型控制器移动微针和透明带的分离区并上下移动，与夹持吸管外壁摩擦使得夹持吸管和微针之间有更多的接触，直到在透明带和离开微针的卵母细胞中出现一个洞。一批在 30 个左右的卵母细胞可以通过透明带穿孔在 15 min 内处理完毕。供体和受体可以在同一张玻片上操作，用微滴分开。

（6）将一批透明带穿孔的卵母细胞放入小室中。使用夹持吸管旋转并吸卵母细胞使得在 3 点钟位置能够容易看到透明带开口。由摇杆型控制器操纵的钝头吸管能够容易地进入卵黄周隙。接着轻轻地将附在卵母细胞质膜和很少量细胞质（核质体）上的 GV 核吸入微量移液器吸管。GV 进入吸管轴时停止吸取，然后轻轻取出吸管，使原生质膜重新封上（**图 15.3C～E**）。

（7）然后使用同样的工具将分离的 GV 核质体插入另一个 GV 期预先去核卵母细胞的卵黄周隙中（GV-细胞质）。一个“嫁接卵母细胞”由一个被操纵的卵母细胞构成，其中有一个分离的核质体和一个分离的细胞质，二者仍孤立地存在（**图 15.2D** 和**图 15.3F**）。由此产生的 GV-细胞质复合体在加入 IBMX 的 IVM 培养基中，37℃，7％ CO_2 孵育 15～20 min，然后进行电融合。

（8）电融合：将 GV-细胞质复合体放在融合小室中的融合介质和铂电极之间。首先将它们对准 5 V 的交流脉冲 4～5 s，然后在 50 μs 的两个 1.8～2 kV/cm 的直流电脉冲下融合。使用 BTX 2001 Electro Cell Manipulator 完成融合过程，如有必要可以重复 3 次，每次脉冲间隔 30 min。在每次电脉冲后 30 min 监测 GV 核进入细胞质。洗涤融

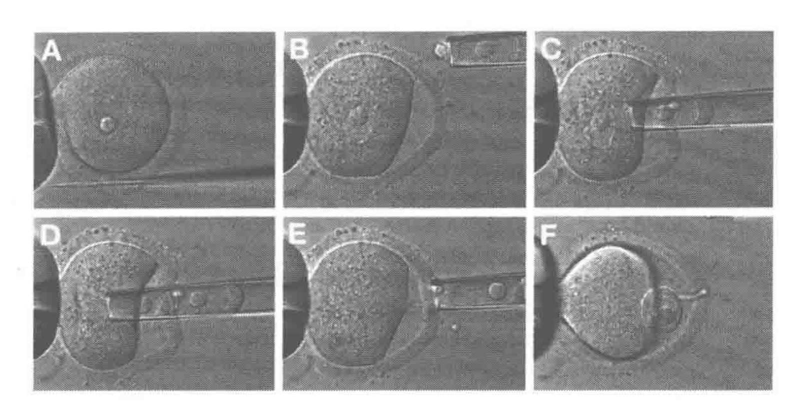


图 15.3　使用微针和钝头吸管进行生发泡（GV）移植

(A) 使用微针在透明带穿孔；(B) 用夹持吸管夹住 GV 卵母细胞。右上角显示含有从原先卵母细胞中取出的 GV 的钝头吸管；(C) 将吸管插入 ZP 中微针穿的孔中，并靠近 GV；(D) 轻吸注射器，用吸管吸出 GV；(E) 夹断吸管中的 GV 与去核细胞质的连接；(F) 使 GV 同另一个去除 GV 的受体卵母细胞紧密接触

合重组的卵母细胞，并在不含 IBMX 的 IVM 培养基中培养（**图 15.2F**），进行体外成熟。

15.3.2　原核转移

1. 收集受精卵

将雌性小鼠根据所在机构的动物管理与使用委员会批准的步骤饲养在 14 h 光照/10 h黑暗的条件下。腹腔注射 5 IU PMSG 使雌鼠超量排卵，46～48 h 后注射 5 IU 人绒毛膜促性腺激素（hCG）。然后将雌鼠单独与已证实有生育能力的雄鼠交配，第二天上午根据阴道塞选择成功交配的小鼠。hCG 注射 20～21 h 后，被卵丘细胞包围的受精卵（0.5 天）从输卵管壶腹被释放到含有 14 mmol/L HEPES、4 mmol/L 碳酸氢钠和 0.03%透明质酸酶的改良 HEPES-缓冲液 KSOM（HKSOM）中，接着轻轻吸去卵丘细胞群。应注意尽量减少透明质酸酶的暴露。依次在 HKSOM 和预先平衡的加入氨基酸和 2.5 mmol/L HEPES 的改良 KSOM 中洗涤不含卵丘细胞的受精卵（***26～28***）。37℃，7% CO_2 的湿润环境下，在矿物油下的 50 μL KSOM 微滴中培养胚胎。

(1) 收集受精卵之前准备培养皿。在 35 mm 培养皿中滴入 8 滴 50 μL KSOM 微滴，然后用 3 mL 矿物油覆盖，在 CO_2 培养箱中孵育至少 1 h 或过夜。

(2) 颈椎脱臼法处死雌性小鼠。

(3) 将动物放回洁净的吸水纸上，用 70%的乙醇沾湿腹部区域。

(4) 用手术剪刀切开一条外侧切口。使用两个镊子向外分别向头部和尾部撕开皮肤。使用弯剪剪开腹膜，暴露腹腔。拉出小肠，露出子宫角和卵巢。

(5) 使用镊子夹住子宫角，使其靠近输卵管，并撕裂下面连接的支持组织。首先在输卵管和卵巢之间切割，然后切开子宫角并将完整的输卵管置于装有 HKSOM 的 35 mm培养皿中。

(6) 对另一条输卵管和其他雌鼠重复此过程。

(7) 在 60 mm 培养皿中滴入一滴（100～200 μL）透明质酸酶和数滴 HKSOM。将分离的输卵管置于透明质酸酶微滴中。

(8) 在实体显微镜下，包含受精卵新的肿胀区域，即壶腹透明且可见。

(9) 使用 Watchman 钳撕开输卵管的壶腹区域并取出受精卵。使用透明质酸酶使取出的受精卵与周围的卵丘细胞群分离。

(10) 用转移吸管将受精卵转移至数滴 HKSOM 中以洗涤受精卵，然后使用 KSOM 洗涤 3 次之后将受精卵放入含有 KSOM 的培养皿中。转移吸管的连接管和过滤器可以由一个 1 mL 注射器的口或者橡胶球控制。

2. 原核移植

使用核移植和电融合完成受精卵之间的原核交换和重构（***29～32***）（**图 15.4**）。

(1) 在显微操纵培养基中孵育受精卵 20 min，HKSOM 中加入了细胞松弛素 D（2 μg/mL）和诺考达唑（2 μg/mL），使得细胞膜在显微操纵之前具有足够的弹性以承受去核微量吸管可能造成的损伤。原核（核质体）的取出和插入都在倒置显微镜（Zeiss Axiovert 100TV，Germany）下进行，并使用 Nomarski 光学和 Narishige 显微操纵器（Japan）。

(2) 在显微操作室中滴加数滴显微操纵培养基，用矿物油覆盖。将操作室置于显微镜载物台上，将显微镜聚焦于培养基微滴的边缘。依次将夹持吸管和核移植吸管固定在显微操纵器的两侧。将 Oil 或 Fluorinet 推到吸管的尖端。将吸管放低至视场中央的培养基微滴中，使用低倍镜（如 4×）。

(3) 在向操作室上部的微滴中转移受精卵之前，在显微操纵培养基中洗涤这一批受精卵。在高倍镜（如 40×）下将夹持吸管和核移植吸管移动至与受精卵相同的焦平面。夹持吸管在负压之下紧紧吸住受精卵，稍稍收回微量注射器，保证原核处于适当的位置以便被看到（**图 15.4A**）。

(4) 轻轻将去核吸管的尖端插入受精卵透明带下的卵黄周隙，避免破坏原生质膜。

(5) 推进斜角吸管尖端使其靠近原核，然后靠近另一个原核。雄性和雌性的原核可以通过位置和大小区分。雌性原核一般较小，大多数情况下更接近第二极体。将显微注射器向后一转，即可轻轻吸出原核和上面的膜至吸管内，同时带出尽可能少的周围的细胞质（**图 15.4B**）。

(6) 当两个原核在吸管中时，慢慢穿过透明带取出吸管，与去核受精卵原核（核质体）相连的质膜被夹断，并自我封闭。将去核受精卵移到操作室的下部，用注射器施加正压力使夹持吸管释放受精卵。将受精卵从上部拿起并放在下部，移动显微镜载物台比移动吸管更方便，效率更高。

(7) 对所有的受精卵重复去核过程，将原核释放到单独的液滴中。在一批 15～20 个受精卵都被去核之后，就产生了一组带有最少细胞质的原核-核质体。

(8) 使用去核吸管将核质体通过去核时产生的洞放在透明带下方，并使其与之前去核受精卵的细胞质紧密接触（**图 15.4C**）。

(9) 与 GV 核移植类似，原核 (PN) 移植也可以通过切割透明带实现 (**注释 9**)。

(10) 在不含抑制剂的标准 KSOM 中洗涤显微操纵胚胎几次，然后将其放回至 CO_2 培养箱中恢复直至融合。

(11) 电融合核质体和细胞质。在融合液中洗涤原核 (核质体) 与去核细胞质的偶联，简单平衡 (2～5 min)。将偶联体置于两个相距 200 μm 的铂电极 (直径 200 μm) 之间，固定在融合室中，手动对齐与电极平行的偶联体接触。然后对诱导融合的偶联体施加交流脉冲 (5 V) 2～3 s 和单次 1.0～1.6 kV/cm 直流脉冲 20～60 μs。交流脉冲使偶联体的质膜与电极更好地接触，从而增加融合效率。使用 BTX Electro Cell Manipulator 放大电脉冲。1 h 后完成成功融合 (**图 15.4D**)。如果偶联体没有融合，则另外施加一次直流脉冲以提高融合效率。电融合通常能够达到大于 90%的效率。

(12) 在 KSOM 中培养重构的受精卵 3 天。培养 24 h 检查胚胎的分裂，48 h 检查桑葚胚的发育，72～80 h 检查胚泡的发育。

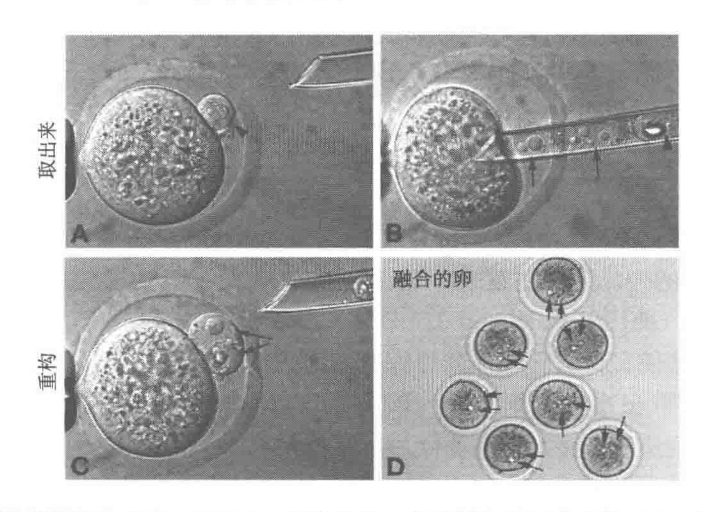


图 15.4　受精卵间的核移植。用斜角显微吸管从一个受精卵中取出原核 (A，B) 并将其与一个去核细胞质紧密接触 (C)，并通过电融合重构 (D)。箭头：原核和第二极体

15.4　注释

(1) 这个 IBMX 浓度防止 GVDB，同时不影响卵母细胞活力以及向有丝分裂中期Ⅱ的进展 (***19***)。Milrinone (米力农) 是一种磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂，也可以代替 IBMX 使用。细胞松弛素 D 用来在显微操作之前增加卵膜弹性。

(2) 显微操纵器和倒置显微镜有许多不同的设计，有些带有电动控制。文中列出的是我们所使用的，也有其他很好的选择，如 Eppendorf 显微操纵器和 Nikon、Leica、Olympus 倒置显微镜。就本章中描述的显微操纵类型来说，手动操作的仪器足以实现方便操作和灵活移动，而且成本较低。列出的老型号可能不再生产，但原则上新型号仪器与旧型号类似或更好用。

（3）显微操作中如果发生震动并导致问题，则需要防震台或气垫桌。

（4）显微工具的质量影响显微操作的效率。夹持吸管的外径应与包含透明带的卵母细胞或胚胎相近或略小，使得在夹持及操作时卵母细胞或胚胎能够与显微操作室底部接触。合适大小的吸管轴也会提供更好的吸力并使卵母细胞和胚胎产生更好的光学成像。夹持吸管应有合适的孔径，约为卵母细胞或胚胎直径的20%，以便固定细胞。

（5）如果吸管尖端不洁净（如有玻璃屑污染），应当使用氢氟酸清洗。吸管通过软管与洁净注射器相连，在装有稀释的（10%，*V/V*）氢氟酸的塑料管中润洗斜面尖端几秒钟。当空气从吸管中排出时，氢氟酸会使尖端的外表面变薄。将尖端在无菌蒸馏水中润洗多次（通过更换水瓶实现），然后用100%乙醇洗涤并干燥。

（6）也可以使用 Nonidet P-40（NP-40）覆盖吸管尖端，通过更换蒸馏水 3 次以润洗若干次并烘干。如果无法买到 NP-40，则可以使用 Sigma 提供的类似液体，名称为 Igepal CA-630。

（7）裸露卵母细胞的体外成熟需要丙酮酸作为能量补充（***33***）。没有卵丘细胞群的卵母细胞的成熟不需要促性腺激素。GVBD 通常发生在成熟 2～3 h 内，成熟培养 15～16 h 后，＞90%的细胞突出一个极体并进入 MⅡ 阶段。固定剥除了卵丘细胞群的卵母细胞以进行免疫细胞化学法（***34***）。用抗-*β*-微管蛋白或抗-*α*-微管蛋白和异硫氰酸荧光素（FITC）-偶联的抗鼠 IgG 染微管，用 Texas Red-偶联的鬼笔环肽染肌动蛋白微丝，用 Hoechst 33342 染 DNA。在 Vectashield 封闭液（Vector Laboratories，Burlingame，CA）中使玻片上的样品封闭在盖玻片下，使用 Zeiss 荧光显微镜（Axioplan 2 成像）观察，用 AxioCam（使用 AxioVision 3.0 软件）捕获图像。

（8）用注射器使夹持吸管吸住卵母细胞。用一个尖锐的斜角吸管穿过透明带并靠近 GV。用斜角吸管取出由少量细胞质（核质体）包围的 GV（**图 15.2A～C**）。去核时，尽量少地取出细胞质使寄主细胞质在随后的核成熟中最大程度发挥积极影响。第二种方法的优点是不需要打磨吸管的斜角，而缺点是取出 GV 需要两步。第一种方法与此相反。然而，就显微操作速度和操纵的卵母细胞存活而言，两种方法的显微操作效率类似。

（9）PN 核移植的另一种替代方法是首先用玻璃针切开透明带，然后用钝头核移植吸管转移原核。将玻璃针插入受精卵的卵黄周隙，移到夹持吸管下面，与夹持吸管的外壁摩擦以切开透明带。很短时间内就能够切开一组受精卵透明带。钝头吸管插入透明带的开口以转移原核，然后如斜角吸管那样转移。这种方法不需要斜角尖锐的吸管，因而不需要微刻磨机，也不需要用酸和水清洁和洗涤吸管。这两种方法的原核移植效率相似。

（10）笔者建议在显微操作中同时参照 GV 核转移和 PN 转移，比较异同点。在 GV 核转移中，核转移吸管比 PN 转移中使用的略大，因为 GV 相对较大。

参 考 文 献

1. Keefe, D. L. (1998) Reproductive aging is an evolutionarily programmed strategy that no longer provides adaptive value. *Fertil. Steril.* **70**, 204-206.

2. Navot, D., Bergh, P. A., Williams, M. A., et al. (1991) Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet* **337**, 1375-1377.
3. Plachot, M., Veiga, A., Montagut, J., et al. (1988) Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum. Reprod.* **3**, 627-635.
4. Hassold, T. and Chiu, D. (1985) Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum. Genet.* **70**, 11-17.
5. Battaglia, D. E., Goodwin, P., Klein, N. A., and Soules, M. R. (1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum. Reprod.* **11**, 2217-2222.
6. Angell, R. (1997) First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 23-32.
7. Volarcik, K., Sheean, L., Goldfarb, J., Woods, L., Abdul-Karim, F. W., and Hunt, P. (1998) The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum. Reprod.* **13**, 154-160.
8. Hassold, T. and Hunt, P. (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 280-291.
9. Wolstenholme, J. and Angell, R. R. (2000) Maternal age and trisomy—a unifying mechanism of formation. *Chromosoma* **109**, 435-438.
10. McKim, K. S. and Hawley, R. S. (1995) Chromosomal control of meiotic cell division. *Science* **270**, 1595-1601.
11. Janny, L. and Menezo, Y. J. (1996) Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 31-37.
12. Arbuzova, S., Hutchin, T., and Cuckle, H. (2002) Mitochondrial dysfunction and Down' s syndrome. *Bioessays* **24**, 681-684.
13. Beermann, F., Hummler, E., Franke, U., and Hansmann, I. (1988) Maternal modulation of the inheritable meiosis I error Dipl I in mouse oocytes is associated with the type of mitochondrial DNA. *Hum. Genet.* **79**, 338-340.
14. Nicolaidis, P. and Petersen, M. B. (1998) Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. *Hum. Reprod.* **13**, 313-319.
15. Petersen, M. B. and Mikkelsen, M. (2000) Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenet. Cell Genet.* **91**, 199-203.
16. Liu, L. and Keefe, D. L. (2002) Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum. Reprod.* **17**, 2678-2685.
17. Liu, L. and Keefe, D. L. (2004) Nuclear origin of aging-associated meiotic defects in senescence-accelerated mice. *Biol. Reprod.* **71**, 1724-1729.
18. Cui, L. B., Huang, X. Y., and Sun, F. Z. (2005) Transfer of germinal vesicle to ooplasm of young mice could not rescue ageing-associated chromosome misalignment in meiosis of oocytes from aged mice. *Hum. Reprod.* **20**, 1624-1631.
19. Liu, H., Wang, C. W., Grifo, J. A., Krey, L. C., and Zhang, J. (1999) Reconstruction of mouse oocytes by germinal vesicle transfer: maturity of host oocyte cytoplasm determines meiosis. *Hum. Reprod.* **14**, 2357-2361.
20. Takeuchi, T., Ergun, B., Huang, T. H., Rosenwaks, Z., and Palermo, G. D. (1999) A reliable technique of nuclear transplantation for immature mammalian oocytes. *Hum. Reprod.* **14**, 1312-1317.
21. Liu, H., Zhang, J., Krey, L. C., and Grifo, J. A. (2000) In-vitro development of mouse zygotes following reconstruction by sequential transfer of germinal vesicles and haploid pronuclei. *Hum. Reprod.* **15**, 1997-2002.
22. Liu, L. and Keefe, D. L. (2000) Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell

death in mouse zygotes. *Biol. Reprod.* **62**, 1828-1834.

23. Liu, L., Trimarchi, J. R., Smith, P. J., and Keefe, D. L. (2002) Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging Cell* **1**, 40-46.
24. Eppig, J. J. and Telfer, E. E. (1993) Isolation and culture of oocytes. *Methods Enzymol.* **225**, 77-84.
25. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2003) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Third Edition* (Wassarman, P. M. and DePamphilis, M. L., eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY: p. 192.
26. Lawitts, J. A. and Biggers, J. D. (1993) Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* **225**, 153-164.
27. Liu, Z. and Foote, R. H. (1995) Effects of amino acids on the development of in-vitro matured/in-vitro fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. *Hum. Reprod.* **10**, 2985-2991.
28. Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., and Schultz, R. M. (1995) Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 232-238.
29. McGrath, J. and Solter, D. (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* **220**, 1300-1302.
30. Liu, L., Dai, Y., and Moor, R. M. (1997) Nuclear transfer in sheep embryos: the effect of cell-cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of in vitro matured oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 255-264.
31. Barton, S. C. and Surani, M. A. (1993) Manipulations of genetic constitution by nuclear transplantation. *Methods Enzymol.* **225**, 732-744.
32. Latham, K. E. and Solter, D. (1993) Transplantation of nuclei to oocytes and embryos. *Methods Enzymol.* **225**, 719-732.
33. Schroeder, A. C. and Eppig, J. J. (1984) The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev. Biol.* **102**, 493-497.
34. Liu, L., Ju, J. C., and Yang, X. (1998) Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* **59**, 537-545.
35. Liu, L., Oldenbourg, R., Trimarchi, J. R., and Keefe, D. L. (2000) A reliable, non-invasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Nat. Biotechnol.* **18**, 223-225.

第16章　细胞衰老研究中核酶的利用
Use of Ribozymes in Cellular Aging Research

Custer C. Deocaris，Sunil C. Kaul，Renu Wadhwa

摘要　核酶是类病毒界中自然产生的催化性RNA。实验室中使用核酶对mRNA进行序列特异性切割。自从核酶的发现获得了诺贝尔奖，人们对使用核酶沉默致病基因的基因治疗药物产生了相当大的兴趣。这项技术并不完美，但对天然核酶加以改变后，这些RNA分子就能够执行多种任务。本章我们重点介绍两种构造的核酶：常规以及杂交锤头状核酶。这里介绍的杂交核酶是基本锤头状核酶的改进版本，具有以下特点：①使用RNA聚合酶Ⅲ（polⅢ）tRNA^{val}启动子实现高水平转录；②5′端与三叶草形tRNA^{val}相连，提高胞内稳定性和胞质转运；③3′端poly（A）尾部作为内源性RNA解旋酶的“分子锚”，赋予核酶解开目标mRNA高级结构的能力。随机杂交核酶库已成功用于揭示基因功能，包括转移、侵染、分化、凋亡，内质网应激，并可能扩展至基因在人类细胞先天的或诱导的衰老中的功能。

关键词　锤头状核酶；随机核酶；RNA-蛋白质杂交核酶；核酶库；寿命蛋白；基因沉默；衰老

16.1　引言

锤头状核酶发现于破坏经济作物的类病毒中，是已知最小的“RNA剪刀”之一。核酶包括两个结构域：底物结合区域（主干Ⅰ和Ⅱ），和催化核心（主干环Ⅱ）（**图16.1**）。其内在的催化特性使得它能够很容易地在体外NUX三元序列位置（N为任何碱基；X＝A，C或U）切割目标基因。然而，在生物体系中，体内基因沉默的成功率很低，因此第一代核酶作为主要的后基因组分子工具的普及程度并不高。然而，毫无疑问的是，核酶调控的基因沉默仍是一个非常有用的基因工具，理由如下：

（1）不会在哺乳动物细胞中诱发干扰素反应。

（2）特异性强，避免“偏离目标”。

（3）可以灵活地设计核酶的结构，使其具有特定功能，如在一个“大”核酶上结合变构可控的“智能”传感器手臂（***1***）。

（4）无需酶即可切割序列。

（5）可以像“弹性”核酶一样在生物条件，以及非理想的甚至工业条件下发挥作用（***2***）。

（6）不需要事先知道目标序列就可以沉默基因，因而适合使用随机核酶发现基因

(**3～6**)。

(7) 具有临床应用的潜力，如抗 HIV-1 核酶和抗 VEGF 核酶 (angiozyme) 正在分别进行第一和第二阶段人体试验 (**7**，**8**)。

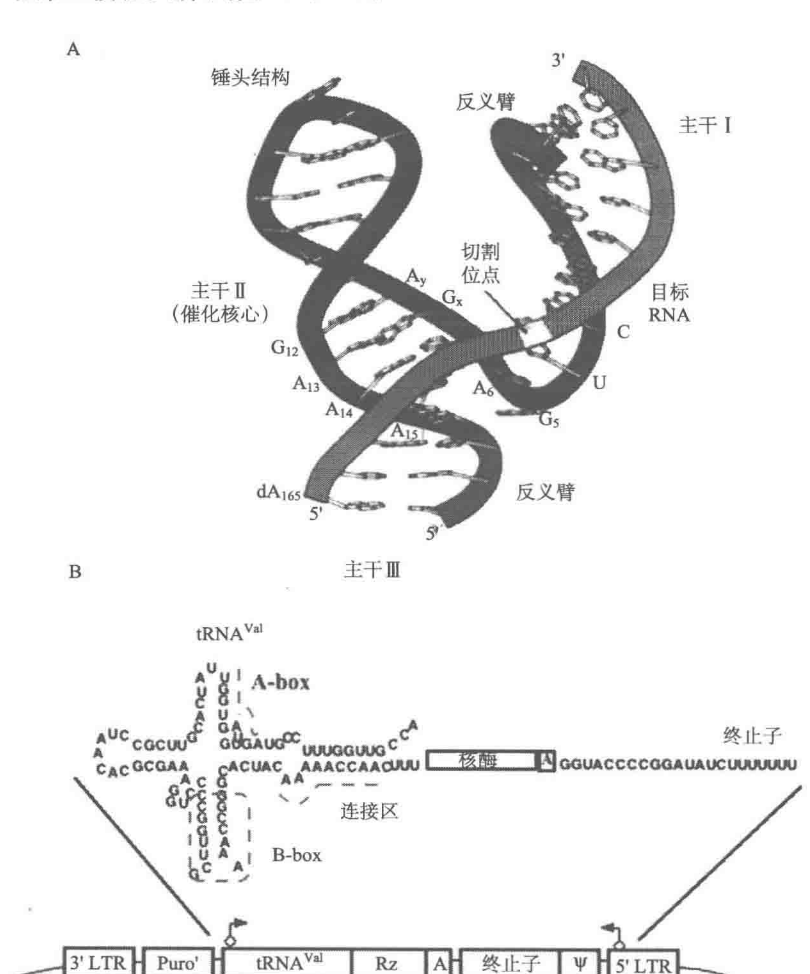


图 16.1　寿命蛋白 tRNA^{val} 锤头状核酶的设计

(A) 反式作用锤头状核酶的结构。其反式切割活性由催化核心或发挥酶作用的主干-环 II 以及底物识别区域(主干 I 和 III) 调控。镁离子被捕获，使得催化核心正确折叠，并有利于目标基因中三元序列 NUX (N 为任何碱基；X＝A，C 或 U) 处的切割；(B) 核酶表达系统。核酶连接在带有 tRNA 启动子的 tRNA^{val} 上，A 和 B box 在转录起始位点下游。核酶被连接入位于载体连接区的 *Csp*45 I 和 *Kpn* I 位点之间 (**参考文献 16**，Elsevier 公司许可)

那么，什么是能敲除体内基因并且具有 RNA 治疗剂优势的"理想"核酶呢？尽管核酶技术受到技术缺陷的困扰，但也具有**表 16.1** 和**图 16.1B** 中列出的突出的特点和分

支。这些创新已应用于生物老年学研究中若干基因敲除实验［见 Deocaris 最近的综述（***9***）］。新一代核酶的另一用途是使用随机核酶库发现设计特定表型的基因。通过使用大量多样的核酶抑制特定基因的表达，可以识别特定通路中的功能基因。事实上，本研究组已使用这一方法确定了不同的细胞表型中的新基因功能，包括转移、凋亡和分化。

表 16.1　设计理想的核酶

技术问题	解决方法	原理	参考文献
核酶表达水平低	使用基于 pol Ⅲ的启动子（如 tRNA和 U6），而非基于 pol Ⅱ的系统（如构成型的 CMV 和 RSV，诱导型的 MT 和蜕皮激素等）	基于 pol Ⅲ的启动子非常适合短 RNA 的转录，转录水平比基于 pol Ⅱ 的系统高 2～3 倍	***17***
无法在胞质中定位 RNA 靶点	在核酶上附加一个外来结构，如三叶草 tRNA 结构	细胞核中的前体-mRNA 被迅速输出到胞质中进行翻译。核酶与胞质中的目标共定位时，与在细胞核中相比显示出较高的活性。与核酶相连的三叶草形状的 tRNA 允许其在输出蛋白-T（Xpo0）协助下有效地通过核孔进入胞质，Xpo0 是驱动 GTPase 的 tRNA 结合蛋白	***18***
细胞内稳定性差	在核酶和 tRNA 结构之间加入连接区	适当的连接序列阻止核酶的降解，并使核酶转录维持在稳定的水平	***3，11***
目标序列隐藏在复杂 RNA 中	与结合胞内解旋酶的序列基序，即 CTE 或 poly（A），偶联，构成蛋白-核酶复合物或杂交核酶	两种基序都与内源性解旋酶作用。构成型转运单元（CTE）使 RNA 解旋酶 A 和 poly（A)序列通过 poly（A）-结合蛋白（PABP）和 PABP-相互作用蛋白 1（PAIP）的作用与 eIF4AI 结合	***3，19***

16.2　材料

16.2.1　构建锤头状核酶表达质粒

（1）$tRNA^{val}$表达载体：

（a）pKE-PUR（常规核酶使用）：如 Koseki 和同事所述（***10***），这一基于 pUC19 的质粒在 *Eco*R Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 限制位点之间插入了人类 $tRNA^{val}$启动子。核酶插在连接区的 *Kpn* Ⅰ 和 *Csp*45 Ⅰ 之间。

（b）pKE-PUR（A）［杂交 poly（A）-核酶使用］：如 Kato 等所述，在 pKE-PUR 载体的 *Kpn* Ⅰ 限制位点下游插入 60 nt-poly（A）（***3，11***）。

（2）模板 DNA：

（a）基因特异性核酶：5′TCC CCG G（ttc gaa)$_{Csp451}$ ↓ ACC GGG CAC TAC AAA AAC CAA CTT T（X_9）CTG ATG AGG CCG AAA GGC CGA A（X_9）（ggt acc)$_{KpnI}$CCG ↓ GAT ATC TTT TTT T 3′；X_9 是 9 bp 的基因靶序列，粗体字与锤头状核酶序列对应，括号内是两个限制位点（由向下箭头标示），下划线的序列是 $tRNA^{val}$（**注释 1**）。

（b）随机杂交核酶：5′CCG G（ttc gaa)$_{Csp45I}$ ↓ ACC GGG CAC TAC AAA AAC CAA CAA NNNNNNNNN CTG ATG AGG CCG AAA GGC CGA AA NNNNNNNN A（ggt acc)$_{KpnI}$ CCG ↓ GAT ATC TTT TTT T 3′；随机接合臂由N所指定的核苷酸构成。

（3）引物（10 μmol/L）：

（a）特异性基因靶序列：引物A：5′TCC CCG GTT CGA AAC 3′；引物B：5′AGA AAA AAA GAT ATC CGG GGT ACC 3′。

（b）随机杂交核酶库：引物X：5′CCG GTT CGA AAC CGG GCA C 3′；引物Y：5′AAA AAA AGA TAT CCG GGG TAC CT 3′。

（4）*Taq* DNA聚合酶（5 U/μL）（TAKARA，Japan）。

（5）限制酶：*Csp*45Ⅰ（8 U/μL）和*Kpn*Ⅰ（10 U/μL）（TOYOBO，Japan）。

（6）10×*Taq*聚合酶缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl，pH 8.3，15 mmol/L $MgCl_2$，500 mmol/L KCl。

（7）TE缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0；1 mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）。

（8）10×L（低盐）缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L二硫苏糖醇（DTT）。

（9）50×TAE缓冲液：2 mol/L Tris-乙酸，0.05 mol/L EDTA，pH 8.0。

（10）dNTP混合物（dATP、dCTP、dTTP和dGTP各2.5 μmol/L）。

（11）嘌呤霉素（Sigma）。

（12）乙醇：99.9%和70%（*V/V*），用蒸馏水稀释。

（13）苯酚和氯仿。

（14）琼脂糖。

（15）琼脂糖凝胶DNA纯化试剂盒（如QIAquick凝胶提取试剂盒，Qiagen，Hilden，Germany）。

（16）DNA连接试剂盒。

（17）感受态大肠杆菌细胞（JM109，DH-5α）。

（18）Luria-Bertani（LB）培养基：10 g蛋白胨，5 g酵母提取物，10 g NaCl溶于1 L蒸馏水中。

（19）LB氨苄西林（Amp）平板（4℃保存）。

（20）含Amp的LB肉汤（4℃保存）。

（21）氨苄西林（10 mg/mL，过滤灭菌，在冰箱中保存）。

16.2.2 体内分析核酶活性

1. 哺乳动物细胞培养和转染

（1）细胞系（如HT1080、MCF7和COS7）。

（2）Dulbecco's modified Eagle's Medium（DMEM），添加10%热灭活的胎牛血清

HyClone (Gibco/BRL，Bethesda，MD)。

(3) 胰蛋白酶 (0.25%) 和乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (1 mmol/L) (Life Technologies)。

(4) 抗生素混合物 (如抗生素-antimyoctic，Gibco/BRL)。

(5) 转染试剂 (FuGENE 6，Roche Applied Science；LipofectAMINE PLUS，Life Technologies)。

(6) 无血清培养基 (如 OptiMEM，Gibco/BRL)。

(7) PBS 缓冲液：8 g NaCl，0.2 g KCl，1.15 g Na_2HPO_4，0.2 g Na_2HPO_4 溶于 1 L 蒸馏水中；我们用购买的 10×PBS (不含钙镁离子，Gibco/BRL) 代替。

2. 荧光素酶报告基因检测

(1) 合适的外源性报告质粒。

(2) 细胞裂解缓冲液 (如被动裂解液，Promega，Madison，WI)。

(3) 荧光素酶检测试剂盒 (如 PicaGene Kit，Tokyo，Japan)。

(4) 不透明底 96 孔板 (Falcon，Becton Dickinson Labware，NJ)。

3. RNA 分离，Northern 印迹法和逆转录 PCR

(1) RNA 分离试剂 (如 ISOGEN reagent，Wako，Japan)。

(2) 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水：以 1∶1000 的稀释倍数向去离子水中加入 DEPC。室温放置过夜，第二天高压灭菌。

(3) 10×RNA 上样缓冲液：50% 甘油，10 mmol/L EDTA，0.25% (*m/V*) 溴酚蓝，0.25% (*m/V*) 二甲苯蓝。使用 4℃保存的 DEPC 水配制。

(4) 杂交缓冲液 (如超灵敏杂交缓冲液，Ambion，Austin，TX)。

(5) 洋地黄皂苷裂解缓冲液：50 mmol/L HEPES/KOPH，pH 7.5，10 mmol/L 乙酸钾，8 mmol/L $MgCl_2$，2 mmol/L EGTA，50 μg/mL 洋地黄皂苷。

(6) 10×C T4 多核苷酸激酶 (PNK) 缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl，pH 8.0，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT。

(7) 20×MOPS 缓冲液：0.4 mol/L MOPS，pH 7.0，100 mmol/L 乙酸钠，20 mmol/L EDTA。

(8) 2×SSPE 缓冲液，含 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS)：1.5 mol/L NaCl，17.3 mmol/L NaH_2PO_4，2.5 mmol/L EDTA，0.1% SDS。

(9) 尼龙膜 (如 Hybond-N nylon membrane，Amersham Co.，Buckinghamshire，UK)。

(10) γP^{32}-ATP (10 mCi/mL)。

(11) 甲醛：12.3 mol/L，溶于去离子水中。

(12) 溴化乙锭，200 μg/mL (致癌，小心操作)。

(13) T4 PNK (10 U/μL)。

(14) 逆转录酶 (如 Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶，Stratagene，Austin，TX)。

16.2.3　选择特定表现型中涉及的活性核酶

1. 逆转录病毒基因传递和表型选择

（1）PLAT-E 包装细胞（小鼠细胞用）和 PT-67（人类细胞）。

（2）肌肉分化中发现基因用 C2C12 肌细胞。

（3）pMX-puro/Rz 库。

（4）凝聚胺（hexamidimethrin bromide）（Sigma）。

（5）分离菌落用无菌环。

2. TA 克隆与测序

（1）pGEM-T 试剂盒（Promega，Madison，WI）。

（2）IPTG（Sigma）。

（3）T7 和 M13R 引物。

（4）BigDye 终止子 v1.1 循环测序试剂盒（Applied Biosystems Inc，Warrington，UK）。

16.3　方法

16.3.1　预测 RNA 的二级结构和选择核酶目标位点

鉴于核酶切割反应的决速步骤是它与目标 RNA 结合或退火（***12***），预测有效的寡核苷酸结合位点是一个重大问题。杂交核酶可以有效克服底物的可接近性带来的局限性（**表 16.1**）。

组合寡核苷酸阵列、RNaseH 切割法以及核酶库（***12～14***）是确定（常规）核酶的最佳目标位点的几个复杂的实验方法。我们建议使用如 Mfold 的 RNA 自由折叠软件简单测试 RNA 的可接近性。但需要注意的是，计算机辅助方法不能说明 RNA 的高级结构。

（1）使用 Mfold 程序预测目标 RNA 的二级结构（ftp：//iubio. bio. indiana. edu/molbio/mac/mulfold. hqx）（**注释 2**）。

（2）可能的话，在起始密码子下游 500 个碱基之内搜索 NUX 三元序列（N 为任何碱基；X＝A，C 或 U）（**注释 3**）。

（3）确定这些 NUX 三元结构是在延长单链区（如环区）还是含有至少约 60%开放性结构的非结构化区域。避开核酶难以接近的稳定的主干结构。

（4）选择候选目标位点。

16.3.2　构建 polⅢ驱动的锤头状核酶表达质粒

1. 设计核酶

（1）确定与含有所选的 NUX 三元序列的 RNA 底物互补的 9 bp 基因目标序列。

（2）用这个 9 bp 序列替换 16.2.1 节（2）中的（a）项中的 X_9 部分，构建杂交核酶。

（3）预测由此产生的结构（**注释 4**）。

2. 准备 DNA 插入物

（1）PCR 反应混合液：1 μL（0.05 μmol 模板 DNA）；100 μmol/L 引物 A 和 B 各 1 μL；10 μL 10×*Taq* 聚合酶缓冲液；10 μL dNTP 混合物；0.5 μL *Taq* 聚合酶；76.5 μL蒸馏水。

（2）执行 25 个 PCR 循环：94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 45 s。

（3）与 1×TAE 进行 2.0%琼脂糖微型凝胶电泳以检验产物，溴化乙锭染色。

（4）用苯酚-氯仿和乙醇沉降纯化 PCR 产物。

（5）对 PCR 产物进行限制性酶切：DNA（1 μg），10×L 缓冲液（10 μL），*Csp*45 Ⅰ（2 U），*Kpn* Ⅰ（2 U），加入足量蒸馏水至 100 μL。37℃孵育 2 h。

（6）用苯酚-氯仿和乙醇沉降提取酶切片段。在 TE 缓冲液中重悬酶切后的插入物。

3. 制备表达载体

（1）使用 *Csp*45 Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ各 5 U（在 1×L 缓冲液中，混合液总体积为 100 mL）37℃酶切 2 μg pKE-PUR 载体 2 h。

（2）使用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检查酶切后的载体。

（3）在紫外（UV）光下，迅速切下含有被酶切的载体的凝胶（**注释 5**）。

（4）使用凝胶提取试剂盒（如 Qiagen）纯化酶切后的载体。

（5）混合酶切后的载体（0.03 pmol）和插入物（0.1～0.3 pmol）最终体积为5 μL。加入 5 μL DNA 连接试剂盒（Takara）Ver.2 的溶液Ⅰ。16℃孵育至少 4 h。

（6）转化感受态大肠杆菌细胞：在冰上与连接混合物孵育 2 h，接着进行 42℃热激（90 s），恢复（在冰上，2 min），然后加入 SOC 培养基，37℃摇晃孵育 40 min。

（7）将细胞置于含有 100 μg/mL 的 LB 琼脂上，孵育平板 12～16 h 直到菌落变得明显。

（8）进行菌落 PCR，检查质粒的存在。使用无菌牙签或移液枪头挑出至少 5 个菌落，将细菌在 6 μL 蒸馏水中浸一下（在 PCR 管中），然后在分离 LB 琼脂平板上划两条线。

（9）向 PCR 管中加入 1 μL 10×*Taq* 聚合酶缓冲液；1 mL dNTP 混合物；10 μL M13 引物 P7 和 P8 各 0.5 μL，1 U *Taq* 聚合酶。

（10）按如下程序执行 PCR 扩增：94℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 1 min，进行 25 个循环。使用阴性克隆（未转化的）作为对照。

（11）对 PCR 产物进行 2.0% 琼脂糖微型凝胶电泳，溴化乙锭染色使 DNA 可见。

（12）对阳性克隆中的 DNA 进行小量制备分离，检查所构建的载体的核苷酸序列。

16.3.3　体内分析核酶的表达和活性

使用瞬时或稳定转染分析核酶对细胞的作用。瞬时转染适用于合适的测试系统中，如荧光素酶报告基因检测（16.3.3 节中 1. 小节），快速确定核酶是否在体内起作用。

如果预期表型能够在 96 h 内检测到，可以进行瞬时转染。稳定转染适用于确定如 mRNA（如 Northern 印迹法）或蛋白质（如 Western 印迹法）的稳态水平的表型。

1. 通过荧光素酶报告基因检测确定核酶活性

荧光素酶报告基因检测系统是目前测定核酶对基因表达的沉默作用的最好的无毒、快速、灵敏的方法。使用荧光素酶报告基因系统的基本步骤如下：①构建合适的荧光素酶报告载体。②将质粒 DNA 转染入细胞。③制备细胞提取物。④测量提取物的荧光素酶活性。

（1）接种细胞至 12 孔板，生长至 80%铺满。

（2）使用 LipofectAMINE 和下列试剂转染：1～3 μg 核酶表达载体，0.1～0.5 μg 报告质粒（编码目标基因荧光素酶融合蛋白）。

（3）37℃孵育转染细胞 24～48 h。

（4）加入 100 μL 1×细胞裂解缓冲液，室温温和振荡 15 min（**注释 6**）。

（5）将 20 μL 裂解产物分装入不透明底 96 孔板中。注意不要加入细胞团。每种处理方法做 4 个平行实验。

（6）加入 100 μL 荧光素溶液，立即在酶标仪上读出光强度。

2. 确定核酶的稳定表达

1）RNA 分离

（1）吸弃培养基，向细胞中直接加入 1 mL ISOGEN 试剂。4℃孵育混合物 10 min（**注释 7**）。

（2）在不含 RNase 的管中收集细胞悬液，向裂解产物中加入 200 μL 氯仿，剧烈混合 15 s。4℃，12 000 *g* 离心混合物 15 min 以促进两种溶剂的分离。

（3）转移上层水相至新管中，加入 500 μL 异丙醇。离心，弃上清液。向沉淀中加入 1 μL 70%乙醇，4℃，12 000 *g* 再次离心 2 min。

（4）弃上清液，在通风橱中风干沉淀 5 min。最后加入 30 mL DEPC 处理过的水。用分光光度计测量 RNA 浓度。

2）使用 Northern 印迹法分析核酶的表达水平

（1）准备变性反应混合物：

（a）5.5 mL RNA（约 2 μg）溶液。

（b）1.0 mL 20×MOPS 电泳缓冲液。

(c) 3.5 mL 12.3 mol/L 甲醛。

(d) 10 mL 甲酰胺。

(e) 1.0 mL 溴化乙锭（200 μg/mL）。

(2) 65℃孵育 RNA 溶液 15 min，然后将样品置于冰上 5 min。

(3) 向样品中加入 2 mL 10×RNA 电泳上样缓冲液。

(4) 将样品上样至含 2.2 mol/L 甲醛的 2.0%琼脂糖凝胶上，在 1×MOPS 缓冲液中进行电泳。

(5) 在紫外透射仪下检查 RNA 质量。

(6) 将 RNA 转移至尼龙膜（如 Hybond-N）12～16 h。接着紫外照射使 RNA 与膜交联。

(7) 在杂交缓冲液中，42℃孵育膜 1 h（**注释 8**）。

(8) 在这一预杂交步骤中，对探针进行放射性标记。以 100 μL 反应体积，37℃混合 10×T4 PNK 缓冲液（10 μL），^{32}P-ATP（50 μL），以及 4 PNK（10 U）30 min。

(9) 95℃加热 5 min 使探针变性。接着将反应管放在冰上。

(10) 向预杂交溶液中直接加入变性探针，42℃ 孵育 12～16 h。

(11) 吸出杂交溶液，然后 42℃，在含有 0.1% SDS 的 2× SSPE 中洗涤膜 2 次，10min。

(12) 用吸水纸吸干膜，在感光成像仪下检测图像。

3) 使用逆转录 PCR 分析核酶的表达水平

(1) 在逆转录（RT）反应之前，65℃在 10 μL 体积中加热 5 μg 总 RNA 5～10 min，然后置于冰上。

(2) 向 1.5 mL 微量离心管中加入如下组分：10.0 μL 热变性 RNA，3.0 μL 10×PCR 缓冲液，2.5 μL 10 mmol/L dNTP，6.0 μL 25 mmol/L $MgCl_2$，1.0 μL 引物 D（1.8 μg/mL），0.5 μL MMLV 逆转录酶和 17.0 μL 水（**注释 9**）。

(3) 42℃孵育 RT 混合物 1 h。

(4) 95℃变性 cDNA，然后置于冰上。

(5) 在 0.5 mL PCR 管中混合以下组分以进行 PCR 反应：6.0 μL cDNA 产物，1.5 μL 10×PCR 缓冲液，0.2 μL *Taq* 聚合酶，0.5 μL 引物 1（1.0 μg/μL），0.5 μL 引物 2（1.0 μg/μL），10.3 μL 水。

(6) 进行 20 个循环 PCR，变性：94℃ 30 s；退火：52℃ 45 s；延伸：72℃ 30 s。

(7) 对 PCR 产物在 2%～2.5%琼脂糖凝胶上进行电泳，用溴化乙锭使其可见。

16.3.4　锤头状杂交核酶库的构建和应用

构建锤头状杂交核酶库与 16.3.2 节下描述的基因特异性杂交核酶表达系统类似。它与特异性基因靶向核酶的区别主要在于杂交核酶的催化核心侧翼是完全随机的底物结合区域。在对 PCR 扩增片段限制性酶切后，将其连接入质粒，并用于转化感受态大肠杆菌细胞（**注释 10**）。然而，我们必须维护核酶库的多样性，因此在构建表达质粒时加

入了一些修改。

1. 构建随机杂交核酶库

（1）扩增 DNA 模板［**注释 11** 与 16.3.2 节中 2. 小节，**步骤（2）**］。使用如下 PCR 条件：6～8 个循环，变性（95℃，30 s），退火（55℃，30 s），延伸（74℃，30 s）。

（2）纯化 PCR 产物，用 *Csp*45 Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ 酶切。剪切后，再次纯化 DNA［16.3.2 节中 2. 小节，**步骤（4）～(6)**］。

（3）将 550 ng DNA 插入物与 20 μg 酶切后的质粒连接。这种情况下，使用 pKE-PUR（A）质粒［16.3.2 节中 3. 小节，**步骤（1）～(5)**］（**注释 12**）。

（4）使用 20 μL 感受态大肠杆菌细胞，1 μL 连接产物和 180 μL SOC 进行质粒转化［16.3.2 节中 2. 小节，**步骤（6）～(7)**］（**注释 13**）。然后将 10 μL（用于估计核酶库多样性）（**注释 14**）和 100 μL（用于准备细胞储存）转化的大肠杆菌细胞点在 LB-Amp 琼脂平板上。在余下的 19 μL 细胞悬液上进行质粒 DNA 的小量制备分离。

2. 转染和筛选想要的表现型

使用市售脂质体制备（LipofectAMINE PLUS，LipofectAMINE 2000，FuGENE 6 等）转染核酶库之后，细胞可以用瞬时或稳定转染再次检测。从选定细胞中回收核酶（16.3.4 节中 3. 小节），接着进行至少 2～3 个循环的转染和表型筛选。如果检测表型变化需要更长的孵育时间，有必要建立稳定表达核酶库的细胞系。为此，建议使用逆转录病毒或慢病毒载体，它们都具有很高的转染效率，对维持核酶多样性很重要。

筛选由核酶沉默导致明显表型变化细胞的方法多种多样。用发夹状核酶库转导小鼠成纤维细胞，并直接挑出形成的细胞集落，能够确定永生化相关基因（***15***）。与此类似，本实验室曾使用以下步骤分离参与肌肉分化的基因，作为筛选稳定表达核酶的例子。类似的步骤可用于筛选核酶调控的基因敲除产生的逃脱衰老的细胞群，从而确定参与细胞衰老的基因（***5***，***16***）。

1）使用逆转录病毒载体转染以及嘌呤霉素筛选

（1）在 10 cm 培养皿中培养小鼠包装细胞 PLAT-E 至 70%～90%贴壁。

（2）将 30 μL FuGENE 6 试剂与 570 μL OptiMEM Ⅰ混合，室温孵育 5 min。根据细胞类型使用足量的转染试剂。

（3）加入 10 μg DNA（pMX-puro/Rz 库），室温静置 15 min。

（4）用 10 mL 新鲜 DMEM 替换 PLAT-E 细胞平板中的培养基。

（5）逐滴向细胞中加入 DNA-脂质体复合物，轻轻振荡使转染培养基完全混合。

（6）37℃孵育细胞 8～10 h。

（7）将培养基替换为 10 mL 新鲜 DMEM，32℃孵育 48 h，使 DNA 被包入感染性病毒颗粒中。

（8）收集含有病毒颗粒的培养基。

（9）使用 45 μm 滤膜过滤病毒溶液并加入聚凝胺（8 μg/mL）。

(10) 当大鼠 C2C12 肌细胞达到 80%～90%贴壁时，用 10 mL 病毒悬液替换培养基，37℃孵育 16 h 使病毒感染细胞。

(11) 使用含有 2 μg/mL 嘌呤霉素的 DMEM 培养基孵育 24 h 以筛选细胞，直至 90%～100%贴壁。

2) 筛选核酶抑制的肌肉分化表型

(1) 在分化培养基（含 2%马血清的 DMEM）中孵育细胞。平行对照细胞在 8 天之后实现体外完全分化。每两天更换新鲜培养基（**注释 15**）。

(2) 在显微镜下识别未分化细胞的 LPO 集落并标记。

(3) 除去培养基，用 PBS 洗涤 2 次。

(4) 将“环”置于标记的集落上，加入 50 μL 胰酶-EDTA。

(5) 5～7 min 后，用环取出脱离的细胞，转移至 12 孔板中使其扩增。

3. 回收活性核酶

每当我们将核酶库引入细胞群落时，都必须考虑到，每个转染细胞都可能会含有一个以上的质粒类型。为了排除假阳性目标，需要进行至少 3～4 轮的转染和表型选择。要做到这一点，我们可以合并所有表型改变的细胞，并小量制备质粒得到初步的核酶集合。第一轮筛选分离出的核酶接着用于转化感受态大肠杆菌细胞。使用选出的核酶集合再次进行 2～3 轮的转染，表型选择和质粒分离以减少假阳性。

也可以使用克隆方法，单独选择带有所需表型的细胞并扩增（**5**）。每个克隆进行 2～3 轮表型筛选。在精简目标之后，进行逆转录 PCR（RT-PCR）和测序，即 TA 克隆和使用 T7 引物测序。这种方法使筛选更为严格，在第一轮筛选时只确认少量细胞集落时尤其有效。

1) RT-PCR 反应

使用引物进行 RT-PCR（16.3.3 节中“使用逆转录 PCR 分析核酶的表达水平”大部分的内容）。PCR 条件如下：变性：94℃，30 s；退火：52℃，45 s；延伸：72℃，60 s；20 个循环。

2) TA 克隆和循环测序

(1) 建立如下反应使 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接：pGEM-T（50 ng，1 μL），PCR 产物（100 ng，8 μL），10×连接缓冲液（1.2 μL），T4 DNA 连接酶（1 μL），蒸馏水（0.8 μL）。4℃过夜孵育混合物。

(2) 准备 IPTG 平板，将 LB-琼脂平板倒置，37℃风干 1～2 天。然后加入 40 μL 20 mg/mL X-gal 和 8 μL 100 mg/mL IPTG。用无菌涂布器摊开，放回 37℃备用。

(3) 用 1 μL 连接反应混合物（**注释 18**）转化化学感受态大肠杆菌细胞（**注释 17**）[16.3.2 节中 3. 小节，**步骤（6），（7）**]。

(4) 37℃过夜孵育之后，将平板置于 4℃数小时直至蓝色菌落出现。含有插入物的

菌落为白色（或淡蓝色）。

(5) 使用 T7 和 M13R 引物进行菌落 PCR 检查插入物［16.3.2 节中 2. 小节，**步骤(8)～(11)**］。执行 35 个 PCR 循环：变性：94℃，20 s；退火：50℃，45 s；延长：72℃，1 min。

(6) 扩增 LB 琼脂划线得到的阳性克隆，小量制备质粒。

(7) 进行循环测序，混合以下试剂：质粒 DNA（2 μL 或 500 ng），10 μmol/L T7 引物（2 μL），BigDye 终止子（4 μL），蒸馏水（2 μL）。进行 25 个 PCR 循环：变性：94℃，30 s；退火：50℃，15 s；延伸：60℃，2 min。

(8) 转移 PCR 产物至 1.5 mL 离心管中，使用 70%乙醇沉降 DNA。

(9) 冰上孵育 20 min。

(10) 最大速度离心 20 min。

(11) 加入 100 μL 70%乙醇，离心 5 min。

(12) 吸出多余的乙醇，真空干燥 10 min。

(13) 加入 2 μL 甲酰胺上样缓冲液。

(14) －20℃保存备用。

4. 确定候选基因

由对表型选择出的细胞中活性核酶底物结合臂测序得到的信息，我们能够通过实验［即 5′和 3′DNA 末端快速扩增（RACE）］或简单的生物信息学方法确定候选基因。我

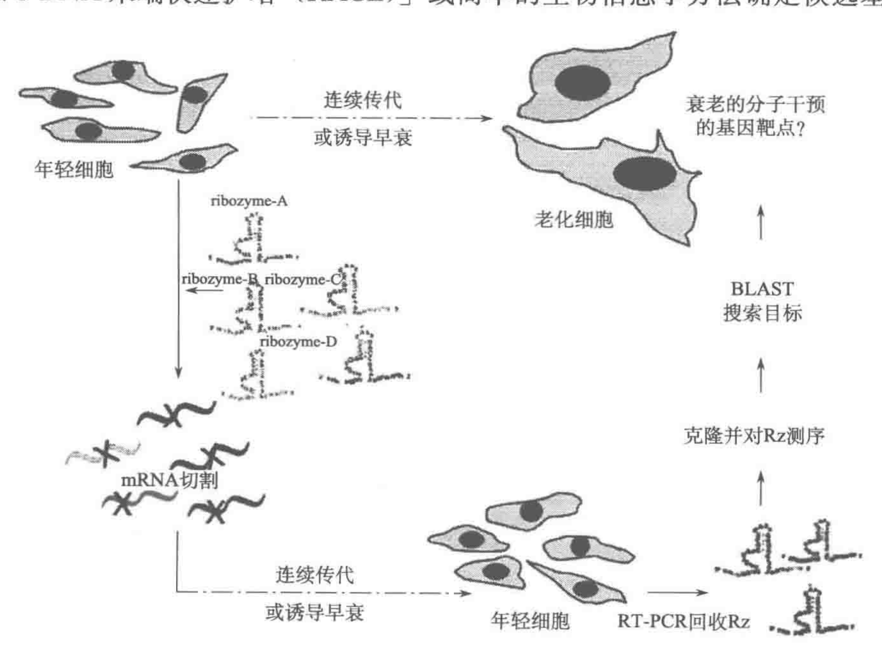


图 16.2　基因发现平台示意图。使用逆转录病毒载体将随机杂交核酶库转染细胞。根据感兴趣的表现型筛选细胞 2～3 个周期。使用逆转录 PCR 回收核酶并测序。活性核酶的基因靶点通过在基因组数据库中搜索来确定（摘自**参考文献 *16***，Elsevier 公司授权）

们实验室从能够公开获取的基因数据库［NCBI（National Center for Biotechnology Informatio）网站中的 Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）程序，http：//www. ncbi. nlm. nih. gov/blast/］筛选目标。如果目标过多，而已知其中很多可能是不相关的，那么可以只搜索 EST（表达序列标签），因为这些往往是核酶的目标。

16. 3. 5 核酶在衰老研究中的使用方法

基因特异性和随机核酶可以扩展到用于识别与正常细胞衰老表型相关的基因，如**图 16. 2**（***16***）和以上的详细方法。这些步骤很可能得到候选肿瘤抑制子或生长负调控物，并进行扩增。它们的使用可以进一步延伸至通过沉默此类关键调节子实现人类细胞的无限增殖化。各种对衰老细胞特异性的检测，如衰老相关的 β-gal 染色、蛋白质损伤积累基因以及肿瘤抑制功能的上调，都可以与之前描述的报告基因检测的方法相结合。此外，可以采用“各种药物诱导癌细胞衰老”作为模型系统以确认维持细胞衰老状态相关的核心调控子，并检测它们在正常衰老中的作用。

16. 4 注释

（1）也可以使用核酶两端 7 bp 的长度：较短的臂多样性较低，而较长的臂在统计上会导致内部二级结构（如凸出），并需要更多合成/反应体积以充分扩大核酶库。

（2）其他预测 mRNA 免费软件可以在 http：//rna. chem. rochester. edu/RNAstructure. html 得到。

（3）GUC 是最有效的切割位点，其次是 CUC 和 AUC。也可以使用其他组合。

（4）组装一个新的 RNA 时，核酶的总体结构可能发生剧变。在预测的杂交核酶二级结构中，$tRNA^{val}$必须保留核转运所需的三叶草结构。另外，核酶的底物结合位点需空出，不能嵌入主干结构内部。

（5）可能的话，调节紫外反式照明灯至最低强度，将 DNA 的损伤降至最低。

（6）避免延长细胞裂解。迅速并小心地分装裂解液、加入荧光素。

（7）在超净台内操作以尽量减少 RNA 降解，最为理想的是有一个处理 RNA 专用的洁净工作台。确保工作台的清洁，在分离 RNA 之前 20～30 min 开启紫外灯。不进行胰酶消化和洗涤，直接向细胞中加入 ISOGEN。加入 ISOGEN 后脱离的细胞可以使用移液器反复吸取来收集，或者刮下来。

（8）推荐过夜孵育时使用超灵敏杂交缓冲液，信号的增强是使用传统杂交缓冲液的 20～50 倍。

（9）反应中不要使用 DEPC 处理的水。过量的 DEPC 会抑制逆转录和 PCR。

（10）质粒也可以电穿孔，电穿孔的转化效率通常高于热激法。然而电穿孔中使用的细胞较少，这将限制核酶库的多样性。

（11）最好将模板 DNA 的浓度定在 0. 02～0. 04 mmol/L。将 PCR 条件限制在 6～8 个循环（而不是常规的 25～30 个），将得到约 20 mmol/L 的足量的插入物。若 PCR 循环多于 8 个，核酶的群体很可能偏向更加“易扩增”的种类。

（12）这一步骤中使用大量的 DNA 和质粒以适应核酶多样性。根据随机核苷酸使用数量，在使用 20 个、15 个或 12 个核苷酸时，多样性分别大致为 10^{12}、10^{9} 或 10^{7}。

（13）在 LB 琼脂上选择之前的回收步骤中要避免大肠杆菌的不均匀复制。因为每个细胞的复制速率不同，在 SOC 中的孵育时间不要超过 60 min，否则理论上带有一种核酶质粒的每个细胞群体的数量将会不同。

（14）在 LB-Amp 平板上孵育转化的大肠杆菌细胞 12～14 h 后，对菌落进行计数以便对核酶库的多样性有所了解。例如，如果在一个初始时从 200 mL 的细胞悬液中取 10 mL加入平板培养，板中有 1000 个菌落，则可以统计上确定核酶库的多样性：1000（菌落）×200（mL）/(10 mL）$=2\times10^{7}$。需要注意的是细菌增殖后多样性会降低，从理论上的 10^{9}（对 15 nt 的臂来说）下降到 10^{7}。

（15）优化分离表型转化细胞时的条件，使背景低于 1%。

（16）pGEM-T 载体 兼容 JM109，DH10B，和 DH5α 品系。

（17）推荐在 LB-IPTG 培养板上加入 100 μL 细胞以获得大于 50 个菌落每板的密度。

（18）可以使用 1 μL 2～4 倍稀释的连接反应混合物。

参 考 文 献

1. Kuwabara, T., Warashina, M., Tanabe, T., Tani, K., Asano, S., and Taira, K. (1998) A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. *Mol. Cell* **2**, 617-627.
2. Ramaswamy, K., Saito, H., Murakami, H., Shiba, K., and Suga, H. (2004) Designer ribozymes: programming the tRNA specificity into flexizyme. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11, 454-11, 455.
3. Kato, Y., Tsunemi, M., Miyagishi, M., Kawasaki, H., and Taira, K. (2004) Functional gene discovery using hybrid ribozyme libraries. *Methods Mol. Biol.* **252**, 245-256.
4. Pan, W. H., Xin, P., Bui, V., and Clawson, G. A. (2003) Rapid identification of efficient target cleavage sites using a hammerhead ribozyme library in an iterative manner. *Mol. Ther.* **7**, 129-139.
5. Wadhwa, R., Yaguchi, T., Kaur, K., et al. (2004) Use of a randomized hybrid ribozyme library for identification of genes involved in muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 51, 622-51, 629.
6. Suyama, E., Kawasaki, H., Nakajima, M., and Taira, K. (2003) Identification of genes involved in cell invasion by using a library of randomized hybrid ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5616-5621.
7. Amado, R. G., Mitsuyasu, R. T., Rosenblatt, J. D., et al. (2004) Anti-human immunodeficiency virus hematopoietic progenitor cell-delivered ribozyme in a phase I study: myeloid and lymphoid reconstitution in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. *Hum. Gene Ther.* **15**, 251-262.
8. Weng, D. E. and Usman, N. (2001) Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr. Oncol. Rep.* **3**, 141-146.
9. Deocaris, C. C., Kaul, S. C., Taira, K., and Wadhwa, R. (2004) Emerging technologies: trendy RNA tools for aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **59**, 771-783.
10. Koseki, S., Tanabe, T., Tani, K., et al,. (1999) Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J. Virol.* **73**, 1868-1877.
11. Kato, Y., Kuwabara, T., Warashina, M., Toda, H., and Taira, K. (2001) Relationships between the activities in vitro and in vivo of various kinds of ribozyme and their intracellular localization in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**, **15**, 378-15, 385.
12. Milner, N., Mir, K. U., and Southern, E. M. (1997) Selecting effective antisense reagents on combinatori-

al oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 15, 537-541.

13. Scherr, M., LeBon, J., Castanotto, D., et al. (2001) Detection of antisense and ribozyme accessible sites on native mRNAs: application to NCOA3 mRNA. *Mol. Ther.* **4**, 454-460.
14. Le, S. Y. and Zuker, M. (1991) Predicting common foldings of homologous RNAs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **8**, 1027-1044.
15. Li, Q. X., Robbins, J. M., Welch, P. J., Wong-Staal, F., and Barber, J. R. (2000) A novel functional genomics approach identifies mTERT as a suppressor of fibroblast transformation. *Nucleic Acids Res.* 28, 2605-2612.
16. Wadhwa, R., Deocaris, C. C., Widodo, N., Taira, K., and Kaul, S. C. (2005) Imminent approaches towards molecular interventions in ageing. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 481-490.
17. Geiduschek, E. P. and Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* **310**, 1-26.
18. Kuersten, S., Arts, G. J., Walther, T. C., Englmeier, L., and Mattaj, I. W. (2002) Steady-state nuclear localization of exportin-t involves RanGTP binding and two distinct nuclear pore complex interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5708-5720.
19. Warashina, M., Kuwabara, T., Kato, Y., Sano, M., and Taira, K. (2001) RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 5572-5577.

第 17 章　评估药物对小鼠衰老和寿命的影响
Methods of Evaluating the Effect of Pharmacological Drugs On Aging and Life Span in Mice

Vladimir N. Anisimov，Irina G. Popovich，Mark A. Zabezhinski

摘要　本章介绍用实验小鼠检测抗衰老药物的方法，包括实验开始时对小鼠品系、性别、月龄的选择，以及饲养条件、长期研究的设计、非侵入性的评价方法、病理检查和结果的统计学处理。

关键词　抗衰老药物；检测；衰老的生物标志；小鼠

17.1　引言

新抗衰老药物的开发越来越受到科学工作者和公众的关注。相应地，有必要制定检测这类药物以及评估其延寿潜力和其他远期效应（如致癌或防癌效果）的标准指导方针（***1***，***2***），应用之一是化学品安全国际项目（International Programme for Chemical Safety）（***3***）。美国国家衰老研究所（National Institute on Aging）也讨论了检测促进健康衰老的生物学干预中的一些原则（***4***）。

检测的指导方针需要包括动物模型、检测方法、生物标志/检测终点等关键点。哺乳动物的生物学特性与人类相似，是最佳的实验模型。从管理、花费、寿命上来说，小鼠模型最为合适。小鼠品系的选择是最重要的问题之一，为得到有基因多样性并与人类接近的病理范围的品系，一些作者提出了应用四交小鼠的方法（***4***）。解决这一问题的另一方法是在同一研究中使用不同的品系，这也是我们在研究中使用的方法。我们使用了 4 种小鼠，分别是：①远系繁殖的小鼠（SHR 或 NMRI）。②同系繁殖的 CBA 小鼠。③衰老加速型 SAMP-1 小鼠。④转基因 HER-2/neu 小鼠（***5～10***）。

检测方法应当无毒、简便、不产生应激并可应用于人类。研究中，一套检测方案可以针对一系列衰老相关的生物标志，如使用裂隙灯检查白内障、认知功能评估（迷宫学习）、检测氧化应激的生物标志（共轭二烯、席夫碱、马龙二醛、SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等）、激素（糖皮质激素、性激素、促性腺激素、促泌乳素、胰岛素、IGF-1、生长激素、瘦素、甲状腺素、三碘甲状腺素）、代谢参数（血糖、胆固醇、β-脂蛋白、三酰甘油、游离脂肪酸）、用微阵列技术检测基因表达谱等。然而，有些方法十分昂贵，并需要大量实验动物。我们的大部分研究中，除了检测存活率，还记录体重、体温、摄食量与饮水量、身体活动度和肌肉力量，并估计了发情功能。为评估药物

的远期效应，我们也进行了包括肿瘤诊断在内的病理形态学检测。适当的数学和统计学模型被用来评估药物在衰老、寿命、致癌方面的效果。

17.2　材料

17.2.1　动物

（1）品系选择。建议在一个研究中使用两个或两个以上品系，包括远系繁殖和同系繁殖的品系。另外，在对特定机制的研究中，需要使用转基因小鼠。

（2）需要对实验选用品系的遗传学、生存以及病理方面的特征有很好的了解。最重要的是，实验室应该有长期使用所选用的品系的经验。

（3）需要使用雌雄两性的小鼠。

17.2.2　居住要求

（1）实验动物的饲养温度和湿度需要控制在标准条件。动物设施系统和一般要求见参考文献（***11***，***12***）。

（2）在实验组和对照组中，每笼的雌性小鼠数量需一致（5 只、7 只或 10 只）。每笼中只允许有一只雄性小鼠以防争斗领地。

（3）标准照明：12 h 光照，12 h 黑暗。

（4）动物可以随意摄食饮水。

17.2.3　仪器和试剂

（1）电子天平（用于称量体重和摄食量）。

（2）标有体积的瓶子（测定饮水量）。

（3）30 cm×21 cm×9 cm 塑料室（用于测定身体活动度）。

（4）电子体温计（用于测量体温）。

17.3　方法

17.3.1　处理开始时动物的年龄

在小鼠 2 个月时（也就是雌性小鼠刚刚成熟后），开始长期的研究。额外机理研究的实验应更晚一些开展。

17.3.2　随机分组

（1）实验开始之前，将动物随机分到对照组和实验组中。

（2）实验动物的数量要足够多，以实现进一步的统计分析（通常每组 30～50 只小鼠）。

（3）所有小鼠都要分别标记。

（4）对照组小鼠需要保持完好，用溶剂处理的剂量以及检测方法都要与实验组相同。

17.3.3　给药途径、剂量、处理方法

（1）最好的给药方式是将化合物加入饮水或食物中。一些难溶或不溶于水的化合物可以先溶解在少量乙醇中，再用水稀释到适当浓度。胃内插管可以用于饲喂精确计量的难溶化合物。

（2）如果被测化合物可以通过在身体侧面皮下注射（0.1 mL，溶于缓冲溶液中）给药，则可以通过非肠道途径给药。腹腔注射或静脉注射导致应激，而且更容易感染。

（3）建议检测两种或两种以上的药物剂量，包括对人类的建议用量。剂量不可超过最大耐受剂量（MTD）。

（4）当把药物加入饮水或食物中给药时，建议每周处理 5～7 天。胃内插管每周实行 3～5 次，皮下注射通常每周 1 次。

（5）最好的方法是长期连续给药，直至动物自然死亡。某些情况下也可以采取间歇性给药。

（6）研究中，需每天观察小鼠，定期记录饮水量、摄食量、体重和体温，评估体力和活力，以及发情功能。

（7）观察动物直至其自然死亡，只在动物濒死时对其进行处死操作。记录每只动物的死亡日期并估计其存活时间。

17.3.4　摄食量

观察的整个过程中每月监测 1 次这一参数，直至每组中的最后一只动物自然死亡。

将标准实验室饲料（每只小鼠 10 g）置于鼠笼上洁净的喂食盒中，24 h 后称量剩余食物（包括喂食盒内和鼠笼上的食物）。计算每只小鼠每天的摄食量。

17.3.5　饮水量

每月监测饮水量。将饮用水装在瓶中（每只小鼠 10 mL），通过 24 h 减少的体积计算每只小鼠每天的饮水量（以毫升为单位）。

17.3.6　体重

每月称量每只小鼠的体重。建议在一天的同一时间称量体重。

17.3.7　体温

每 3 个月，在称量体重时，用电子体温计测量直肠体温。

把小鼠固定在平常的姿势，坐在架子上，尾巴朝上。体温计的电极浸于甘油中，然后插入直肠约 1.0 cm。起初，直肠体温会因为应激和血管痉挛而下降，因此，需要等待至小鼠安静、体温稳定时记录体温。

17.3.8　发情功能

（1）连续 3 周每天取动物的阴道涂片，进行细胞学检查并估计动物所处的发情功能的阶段（每 3 个月实行 1 次）。

（2）用无菌水润湿细棉棒，取涂片，置于预先标记的玻片上，进行组织学研究。

（3）对发情阶段的组织学评估需要在收集阴道涂片后 1～2 h 进行。可以使用 80～100×的放大倍数，在显微镜下观察未经染色的阴道涂片。每天准确检测每只标记动物的阴道涂片，并记录发情前期、发情期、发情后期或发情间期（***13***）。

（4）需要对以下发情功能的参数进行评估

（a）从首次记录到的第一个发情阶段的第一天到下一次发情开始的每个发情周期的长度，以及每组动物发情周期的平均长度。

（b）发情周期中每一阶段的比例。

（c）不同长度发情周期的比例（%）。通常把长度分为<5 天，5～7 天以及>7 天。

（d）具有规律的发情周期的小鼠比例（%）。

（e）具有不规律发情周期的小鼠比例（%）。

17.3.9　“旷场试验”评估小鼠身体活动度的方法

（1）在小鼠 6 个月、9 个月、12 个月、18 个月龄时检测，检测时间在上午 10 点～下午 5 点。

（2）将每组的小鼠逐一置于 30 cm×21 cm×9 cm 的塑料室中，塑料室底部绘有 5 cm×5 cm 的方格，长宽两个方向各为 5 个和 4 个方格。

（3）观察每只小鼠在笼内的运动，评估其移动的参数：①跨过的方格数（动物至少两爪越过方格边界时即视为跨过该方格）；②直立（动物用后足站立）的次数；③对口鼻、身体和生殖器的理毛和修饰行为的持续时间。为了排除嗅觉相关定向反应，每只小鼠测试之后要用湿布擦拭小室的地面。

17.3.10　研究肌肉力量和身体易疲性的方法

（1）在小鼠 6 个月、9 个月、12 个月、18 个月龄时检测，检测时间在上午 10 点～下午 5 点。

（2）称量体重后，将小鼠吊在 80 cm 高的细绳上，用前爪抓住绳子挂在上面。

（3）以秒为单位记录小鼠由于疲劳而从绳子上掉下来的时间。

（4）20 min 后将小鼠重新挂在绳子上并记录在绳子上停留的时间。

（5）2 次测试指标的差异被认为是反映体力恢复能力的参数。另外，可以将这个数据与体重相关联进行评估。

17.3.11　病理形态学检查

（1）对所有死亡的或在垂死时处死的小鼠进行尸体解剖。解剖时需检查皮肤和所有内部器官。

（2）发现肿瘤之后需要根据 IARC（国际癌症研究机构，International Agency of Research on Cancer）的建议将其归类为致命的（直接造成动物死亡）或偶发的（动物另有死因）（***14***）。

（3）切下主要的内部器官、所有的肿瘤以及其他病灶，在 10%中性甲醛中固定。在常规组织学处理之后将组织固定于石蜡中。

（4）用苏木精-伊红将 5～7 μm 的薄组织切片染色并在显微镜下检查；就实验组小鼠而言，这是一个“黑箱式”的过程。

（5）根据 IARC 的建议将肿瘤归类（***15***）。

17.3.12 统计学

（1）使用变异统计方法对实验结果进行统计处理（***14***，***16***）。使用 t 准则、Fischer 精确方法、卡方分析以及 Wilcoxon-Mann-Whitney 非参数准则确定差异的显著性。

（2）估计肿瘤发生率的差异时，应用 IARC 分别计算致命和偶发肿瘤的联表（***13***）以及患病率分析（***16***）。

（3）分析存活率和风险时，Cox 方法（***18***）最为有效。测试两组存活率的等同性时，使用 Taron 寿命表测试（***19***）。存活测试的报告值应当是双面的。

17.3.13 数学模型与估算

（1）这一数学模型（带有存活函数的传统 Gompertz 模型）可以描述接受治疗动物的存活率（***6***）。

$$S(x) = \exp\{-\frac{\beta}{\alpha}[\exp(\alpha x) - 1]\}$$

参数 α 和 β 与老化速率和最初的死亡率相关联。参数 α 通常以 MRDT（死亡率加倍时间，Mortality Rate Doubling Time）表征，计算方法为 $\ln(2)/\alpha$。

（2）模型的参数需要应用高斯统计系统中的最大似然方法由经验数据估计（***20***）。

（3）老化速率参数估计值的置信区间由对数似然函数得出（***18***）。

17.4 注释

（1）对延长寿命药物效果的可用数据的评论表明，根据当前的指导方针，很多研究并不可靠。被测药物通常用于很少数目的动物（10～20 只）；在动物老年才开始治疗，那时很多体弱的动物将会死亡而强壮的小鼠继续生存；观察止于死亡率达到 50%或其他随意的时间，而不是在最后一只动物自然死亡的时候；有时并未实行尸体解剖和正确的病理形态学检查；没有记录体重增长和食物消耗等。

（2）选择小鼠的品系是一个很特殊的问题。测试药物时，需要分析小鼠的基因以及其他的特征。譬如，C57BL/6j 小鼠是最常用来进行延寿研究的动物模型（***21***）。然而，由于 C57BL/6j 小鼠松果体的基因依赖性褪黑素分泌不足（***22***），这一品系并不是一个完善的模型。有一些激烈的争论支持使用杂交或远系繁殖的小鼠（***23***，***24***）。

(3) 实验老年病学研究中也引入了自发或诱导的基因修饰、纯合无效突变、敲除以及转基因哺乳动物(***25***,***26***)。值得留意的是，一些基因操纵在胚胎发育时期以及整个成年阶段都发挥作用，因此并不在动物生命中的特定时间表达出来，这给解释得到的数据带来很大的局限性，**参考文献 *27* 和 *28*** 讨论了这些局限。一方面，除去某个基因的活性或通路带来的代偿性作用可能改变动物的生理，从而导致对基因功能的错误结论。另一方面，过表达某个转基因也可能对寿命或动物其他的衰老参数没有影响。Jazwinski(***27***)注意到，过表达某个转基因可能产生与其他基因以及外部或内部环境的相互作用。尽管如此，我们仍使用变异或转基因小鼠来研究一些药物对长寿的作用(***5～10***)。

(4) 小鼠的性别很重要。我们倾向于使用雌性小鼠，它们不像雄性小鼠那样好斗。使用雌性动物的其他优点是能够记录发情功能，并且肿瘤的种类比雄性更广泛。

(5) 一般而言，各式各样饲养条件都会得出相似的寿命结果。不同更换笼子的频率(1周、2周或3周)以及笼子不同的通风率并没有使小鼠表现出健康状况的区别(***29***)。肮脏不洁的条件对寿命也没有明显影响(***30***)。同时，在无特异病原(SPF, specific pathogenic free)条件下饲养的动物的存活曲线并未表现出明显改善。尽管有报道称无菌条件会延长动物寿命(***31***,***32***)，然而这很可能是由于无菌条件下动物的热量摄取更低(***33***)。

(6) 食物质量和控制很重要(***11***,***34***)。了解食物质量，即脂类含量、动物蛋白的种类、纤维以及少量元素的成分很重要，尤其当某种物质能够干预动物营养状况时。我们在实验中按照常规使用“Volosovo”农业公司(俄罗斯 Leningrad 地区)生产的颗粒饲料。这种饲料含有天然成分：30%小麦，22.7%玉米，4.3%奶粉，12%大豆，20%肉粉，5%酵母，3%脂肪，2%糖浆，1%预混合料。各种营养成分的含量为：25.66%蛋白质，7.0%脂肪，0.7%甲硫氨酸，1.44%赖氨酸，2.04%钙，1.38%磷，0.37%氯化钠；维生素(单位：mg/kg)：维生素 A，5000 i.e.；维生素 D，500 i.e.；维生素 B_1，1 mg；维生素 B_2，2.5 mg；维生素 B_3，2.5 mg；维生素 B_4，120 mg；维生素 B_5，12 mg；维生素 B_6，1.5 mg；维生素 E，50 mg；维生素 K，10 mg；维生素 B_{12}，0.33 mg；维生素 H，02 mg；8 mg 铜；60 mg 铁；2.4 mg 钴；6 mg 镁；5 mg 锌；1.5 mg 碘。总热量为 305 kcal/100 g(***5***)。大体上，这种饮食与 NIH-07 大鼠和小鼠的食物定量配额类似。

(7) 一切实验开始于生长停止之后，这排除了由于生长迟缓造成的寿命延长的假象。有些报道称，在动物12个月或18个月时对其进行处理(***35***)，我们认为，这种实验设计不是评估化合物对过早老化的预防作用的正确方法。

(8) 化合物在水中和食物中的溶解性和稳定性对正确选择给药路径十分重要。如果化合物溶解在水中后对光照敏感，则需使用深色玻璃瓶。

(9) 就处理方法而言，如果之前的机理研究表明间歇性处理最为安全有效，则只推荐间歇性处理。

(10) 需要在一天的同一时间测量饮水量和摄食量、体重和体温。在对发情功能的分析中，需要连续取阴道涂片直至发情周期的最后一天。

(11) 最终分析中，比较不同用量药物的效果以及根据数据推断药物对人类的用量

及效果很重要。

致谢

本文一部分由俄罗斯基础研究基金（Russian Foundation for Basic Research）# 03-04-49468、# 03-04-62468 和 05-04-48110 号拨款，以及俄罗斯联邦总统（President of Russian Federation）# NSh-5054. 2006. 4 号拨款支持。

参 考 文 献

1. Montesano, R., Bartsch, H., Vainio, H., Wilbourn, J., and Yamasaki, H. (eds.) (1986) *Long-Term and Short-Term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal. IARC Sci. Publ.* **83**, IARC, Lyon.
2. Vainio, H., Magee, P., McGregor, D., and McMichael, A. J. (eds). (1992) *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification. IARC Sci. Publ.* **116**, IARC, Lyon.
3. Anisimov, V. N., Birnbaum, L., Butenko, G., et al. (1993) *Principles for Evaluating Chemical Effects on the Aged Population (Environmental Health Criteria 144)*. WHO, Geneva.
4. Warner, H. R., Ingram, D., Miller, R. A., Nadon, N. L., and Richardson, A. G. (2000) Program for testing biological interventions to promote healthy aging. *Mech. Ageing Dev.* **115**, 199-208.
5. Anisimov, V. N., Alimova, I. N., Baturin, D. A., et al. (2003) The effect of melatonin treatment regimen on mammary adenocarcinoma development in HER-2/neu transgenic mice. *Int. J. Cancer*, **103** (**3**), 300-305.
6. Anisimov, V. N., Alimova, I. N., Baturin, D. A., et al. (2003) Dose-dependent effect of melatonin on life span and spontaneous tumor incidence in female SHR mice. *Exp. Gerontol.* **38**, 449-461.
7. Anisimov, V. N., Arbeev, K. G., Popovich, I. G., et al. (2004) Body weight is not always a good predictor of longevity in mice. *Exp. Gerontol.* **39** (**3**), 305-319.
8. Anisimov, V. N., Popovich, I. G., Zabezhinksi, M. A., and Rosenfeld, S. V. (2004) Spontaneous mutagenesis, carcinogenesis and aging in SAM mice: effect of melatonin, epitalon and neuronol. In *Proceedings of the 19th SAM Meeting, Kyoto, 17-18 July, 2004*. (Takeda, T., ed.). Kyoto: pp. 101-102.
9. Anisimov, V. N., Zavarzina, N. Y., Zabezhinski, M. A., et al. (2001) Melatonin increases both life span and tumor incidence in female CBA. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **56A** (**7**), B1-B13.
10. Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A., Egormin, P. A., et al. (2005) Insulin in aging and cancer: new antidiabetic drug Diabenol as geroprotector and anticarcinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1117-1129.
11. Poiley, S. M. (1974) Housing requirements-general considerations. In *Handbook of Laboratory Animal Science. Vol. I.* (Melby, E. C. and Altman, N. H., eds.). CRC, Cleveland: pp. 21-60.
12. Van Zutphen, L. F., Baumans, V., and Beynen, A. C. (eds). (2001) *Principles of Laboratory Animal Science*. Elsevier, New York.
13. Nelson, J. F., Felici, L. S., Randall, P. K., Sims, C., and Finch, C. E. (1982) A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol. Reprod.* **27**, 327-339.
14. Gart, J. J., Krewski, D., Lee, P. N., Tarone, S., and Wahrendorf, J. (1986) *Statistical Methods in Cancer Research. Vol. III-The Design and Analysis of Long-Term Animal Experiments. Lyon: IARC; IARC Scientific Publication*. **79**. IARC, Lyon.
15. Turusov, V. S. and Mohr, U. (eds). (1994). *Pathology of Tumours in Laboratory Animals. Volume I. Tumours of the Mouse (2nd ed.). IARC Scientific Publication*, **111**. IARC, Lyon.
16. Goubler, E. V. (1978) *Computing Methods of Pathology Analysis and Recognition*. Leningrad: Meditsina.
17. McKnight, B. and Crowley, J. (1984) Tests for differences in tumor incidence based on animal carcinogenesis experiments. *J. Am. Stat. Assoc.* **80**, 639-648.

18. Cox，D. R. and Oakes，D. (1996) *Analysis of Survival Data*. Chapman & Hall，London.
19. Taron，R. E. (1975) Tests for trend in life table analysis. *Biometrika*. **62**，679-682.
20. *Gauss System and Graphic Manual*. Aptech Systems，Inc.，Maple Valley (1994).
21. Sprott，R. L. and Ramirez，I. (1997) Current inbred and hybrid rat and mouse models. *ILAR J*. **38**，104-108.
22. Goto，M.，Oshima，I.，Tomita，T.，and Ebihara，S. (1989) Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J. Pineal Res*. **7**，195-204.
23. Miller，R. A.，Chrips，C.，Jackson，A. U.，Galecki，A. T.，and Burke，D. T. (2002) Coordinated genetic control of neoplastic and nonneoplastic diseases in mice. *J. Gerontol. Biol. Sci*. **7A**，B3-B8.
24. Anisimov，V. N. (1987) *Carcinogenesis and Aging*. *Vol. 1*. CRC Press，Boca Raton.
25. Ingram，D. K. and Jucker，M. (1999) Developing mouse models of aging：a consideration of strain differences in age-related behavioral and neural parameters. *Neurbiol. Aging*. **20**，137-145.
26. Anisimov，V. N. (2003) Aging and cancer in transgenic and mutant mice. *Front. Biosci*. **8**，S883-S902.
27. Jazwinski，S. M. (1999) Longevity，genes，and aging：a view provided by a genetic model system. *Exp. Geront*. **34**，1-6.
28. Morgan，W. W.，Richardson，A.，Sharp，Z. D.，and Walter，C. A. (1999) Application of exogenously regulatable promoter systems to transgenic models for the study of aging *J. Gerontol. Biol. Sci*. **54**，B30-B40.
29. Reeb-Whitaker，C. K.，Paigen，B.，Beamer，W. G.，et al. (2001) The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages. *Lab. Anim*. **35**，58-73.
30. Chino，F.，Makinodan，T.，Lever，W. E.，and Peterson，W. J. (1971) The immune systems of mice reared in clean and in dirty conventional laboratory farms. I. Life expectancy and pathology of mice with long life spans. *J. Gerontol*. **26**，497-507.
31. Gordon，H. A.，Bruckner-Kardoss，E.，and Wostmann，B. S. (1966) Aging in germfree mice：life tables and lesions observed at natural death. *J. Gerontol*. **21**，380-387.
32. Pollard，M. (1970) Senescence in germfree rats. *Gerontologia*. **17**，333-338.
33. Snyder，D. L.，Pollard，M.，Wostmann，B. S.，and Luckert，P. (1990) Life span，morphology，and pathology of diet-restricted germ-free and conventional Lobund-Wistar rats. *J. Gerontol*. **45**，B52-B58.
34. Baranova，L. N.，Romanov，K. P.，and Yamshanov，V. A. (1986) Study of the level of benzo (a) pyrene and N-nitrosamines in the food of laboratory animals. *Vorp Onkol*. **5**，54-57.
35. Weindruch，R.，and Walford，R. (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. C. C. Thomas，Springfield，IL.

第 18 章　使用高通量筛选系统确定延长寿命的基因

Identifying Genes that Extend Life Span Using a High-Throughput Screening System

Cuiying Chen，Roland Contreras

摘要　我们开发出一种高通量功能性基因组筛选系统，能够在面包酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）中确定延长寿命的基因。这种方法的基础是根据细胞表面芽痕的数量分离分裂数高于平均值的酵母母细胞。使用荧光标记的小麦胚凝集素（WGA）对芽痕的主要成分——几丁质特异性染色。这个芽痕分选系统的关键新步骤是微珠的使用，这使得母细胞（M-cell）能够连续地纯化、再生长，并可以根据 WGA 特异性标记的芽痕数量，使用流式细胞仪分选并分离长寿命细胞。

关键词　衰老；出芽酵母；小麦胚凝集素；WGA；芽痕；寿命

18.1　引言

面包酵母是衰老研究中最受欢迎的模型之一（*1*～*8*）。其优势在于酵母细胞与哺乳动物细胞有相似的生理变化，而且酵母中通常含有与人类疾病基因相对应的基因（*9*），因此可以在酵母中有效地研究这些基因（*10*～*13*）。

酵母的复制寿命被定义为细胞分裂次数或母细胞（M-cell）在其生命中产生的子细胞（D-cell）的数目。在酵母生长中，每一次细胞分裂都会在母细胞的表面分裂的位置留下一个环形的芽痕。因此，可以通过简单地计数母细胞表面的芽痕确定其寿命（以“代”计）。我们认为，当二者结合的特异性符合实验要求时，小麦胚凝集素（WGA）介导的荧光标记能够使芽痕显现。因此，我们开发了一种新的筛选系统，以母细胞的富集和重复再生长为基础，进行基于芽痕的分选（BSS）步骤（*14*）。使用非常小的磁性微珠来纯化母细胞可以保护细胞免受结合带来的损伤，对维持细胞活力非常重要。

将细胞暴露在应激之下，然后分选出存活者是一种常用的寻找衰老相关基因的方法。然而，仍然不清楚这些基因是由于应激处理还是对衰老的直接作用而被挑选出来。本章的 BSS 筛选方法提供了另外一种直接搜寻人类长寿基因的途径。BSS 筛选系统也可以用来在更加自然、低应激生长的条件下，从各种基因文库或真核生物基因文库组合中筛选出有潜在抗衰老作用的基因。

活性氧（ROS）主要在线粒体中产生，衰老过程中氧化损伤逐渐增强（*5*，*15*）。

所有的证据都表明，长寿物种产生的 ROS 较少，而非对氧化损伤的保护加强。这些研究在单细胞酵母（*S. cerevisiae*）中更易进行。因此，BSS 筛选系统通常可以用于筛选降低 ROS 产生的相关基因。

总之，BSS 过程是一种有效、敏感、迅速、用户友好的、可靠的高通量方法。被分离的基因能够帮助接下来的衰老相关疾病的药物的合理设计以及疗法的开发。

18.2　材料

18.2.1　品系

使用如下 *S. cerevisiae* 品系：INVSc-1（MATα；his3Δ1；Leu2；trp1-289；ura3-52）（Invitrogen，San Diego，CA）；BY4742（MATα；his3Δ1；leu2Δ0；lys2Δ0；ura3Δ0）（Euroscarf，Frankfurt，Germany）；以及源自 BY4742 的 Δ*fob1* 品系（BY4742；MATα；his3Δ1；leu2Δ0；lys2Δ0；ura3Δ0；YDR110w：：kanMX4）（Euroscarf；accession No. Y14044）。

18.2.2　酵母培养

（1）丰富 YPD 培养基（标准酵母完全培养基）：1%酵母提取物、2%细菌用蛋白胨、2%葡萄糖溶于水中（**注释 1**），高压灭菌 25 min。

（2）基本培养基，也称合成培养基（SD 培养基）：0.67%酵母氮源（不含氨基酸）、2%葡萄糖、0.079%完整补充氨基酸混合剂（CSM）溶于水中，高压灭菌 25 min。

（3）高压灭菌之前向液体培养基中加入 2%琼脂，制成 YPD 和 SD 平皿上使用的培养基。高压灭菌后，将烧瓶置于室温 45～60 min 使其冷却到 50～60℃，或将其置于 50～60℃的烘箱内。然后将培养基加入平皿（25 mL/皿）。平皿可以在 4℃保存 1 周。

（4）酵母细胞接种于液体培养基中，30℃，250 r/min 摇晃孵育。通过测量 OD_{600} 控制培养密度。将酵母接种在平皿上，30℃培养 3 天可以观察到菌落。

18.2.3　细胞和芽痕染色

（1）硫代-NHS-LC-生物素（Pierce Chemical Company，Rockford，IL）。

（2）与荧光素异硫氰酸盐偶联的 WGA（WGA-FITC）（Sigma，St. Louis，MO）。

（3）链霉抗生素蛋白-R-藻红蛋白（链霉抗生素蛋白-PE）（Molecular Probe，Eugene，OR）。

（4）抗生物素微珠（Miltenyi Biotec，Bergisch Gladbach，Germany）。

18.2.4　流式细胞仪

在流式细胞仪（Becton Dickinson，Sunnyvale，CA）上进行荧光激活的细胞分选（FACS）。使用 15 mW 氩离子激光器，以 488 nm 的激发波长分析 FITC 和 PE 染色。FL1 检测器检测通过 525 nm 带通滤波器的绿色信号测量 FITC，FL2 检测器检测通过 575 nm 带通滤波器的橙色信号测量 PE。多色染色时，对荧光通道应用电子补偿以消除残余的谱线重叠。每个样品至少检测 10 000 个项目。使用 CELLQuest 软件（Becton

Dickinson，Sunnyvale，CA）对多重变量数据进行分析。

18.3 方法

使用酵母作为衰老的模型需要开发出分离并富集衰老细胞的步骤。BSS 系统包括母细胞的富集和再生长循环，最终分选出寿命较长的细胞。BSS 系统的方案如**图 18.1**所示。

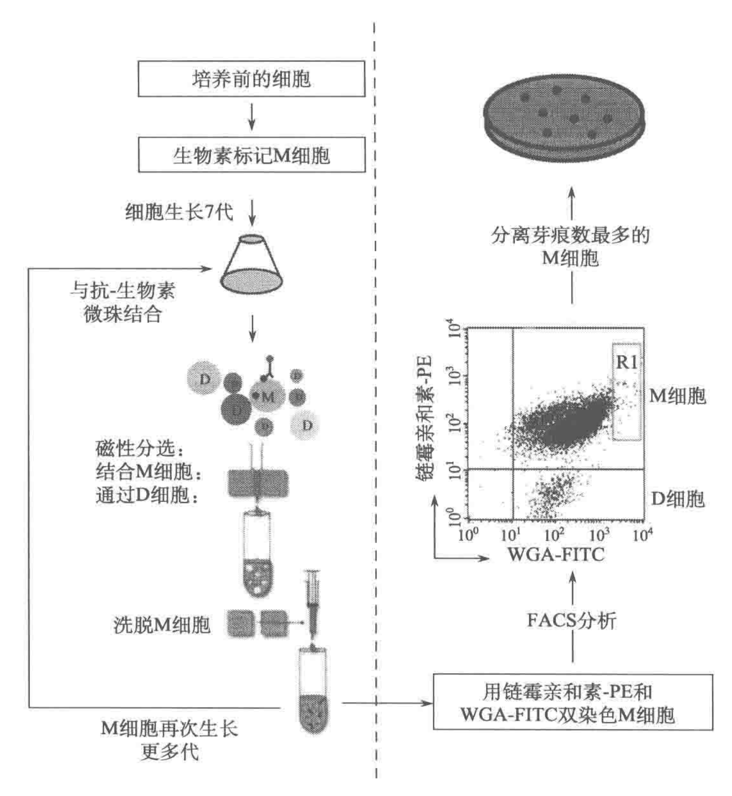


图 18.1 酵母母细胞芽痕分选系统（BSS）示意图。在 BSS 系统含有两个主要步骤。第一步（虚线左侧）是生物素化母细胞的磁性分选，以及必要时使所选的母细胞生长更多代。第二步（虚线右侧）是对芽痕的麦胚凝集素染色，以及使用荧光激活细胞分选芽痕染色的细胞，选出较长寿的母细胞。（M 细胞：母细胞；D 细胞：子细胞）

18.3.1 用生物素标记母细胞

子细胞上检测不到母细胞细胞壁残余（*16*），而母细胞的细胞壁被标记，不进入下一代。因此，生物素与细胞壁上伯氨基的共价结合成为母细胞整个生长阶段的特征，使其很容易与子细胞群的分离。

（1）细胞在 30℃，5 mL YPD 或 SD 培养基中生长过夜。第二天上午，将细胞重悬于 50 mL 培养基中，OD_{600}值约为 0.02，30℃，250 r/min 培养。细胞密度（OD_{600}值）

不可以超过 1（**注释 2**）。

（2）4℃，5000 r/min 离心 10 min，收集细胞，用 1 mL 无菌磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.2）清洗 2 次。得到的全部细胞都当作初始母细胞（**注释 3**）。

（3）标记之前，用 PBS 洗细胞 2 次，将细胞以 2.5×10^7 个/mL 的密度重悬于 PBS 中，接着与 0.2 mg/mL 硫代-NHS-LC-生物素在室温下共同孵育 30 min，轻轻摇动。用 PBS 清洗 2 次，除去未结合的生物素试剂（**注释 4**）。

（4）将生物素化的母细胞接种在液体培养基中，OD_{600} 值为 0.01～0.02，30℃培养至所需要的世代数（我们的实验中培养了 7 代，OD_{600} 值不超过 1）（**注释 2**）。

18.3.2　母细胞的纯化和再生长

应用磁性细胞分选，使用 MACS 分离器（Miltenyi Biotec，http://www.miltenyibiotec.com）将母细胞与子细胞分离。

（1）将 2.5×10^7 个生物素化的母细胞培养 7 代。收集细胞，并用冷 PBS 洗 2 次，再用 30 mL 冷 PBS 重悬。接着将细胞与 60 μL 抗生物素微珠结合，4℃孵育 1 h。用冷 PBS 洗 2 次除去未结合的微珠。将细胞重悬于 5 mL 冷 PBS 中，细胞密度 $< 2\times10^8$/mL（**注释 5**）。

（2）将 LS 柱安装在 MidiMACS 分离器上，用 3 mL 冷 PBS 润洗 2 次。将细胞悬液（5 mL，$\leqslant 2\times10^9$ 个细胞）加在柱上。用 5 mL 冷 PBS 洗柱子2～3 次以除去未生物素化的子细胞（**注释 6**）。

（3）将柱子从 MidiMACS 分离器上取下，用8 mL冷 PBS 洗脱生物素化的母细胞。这些母细胞可以用于再生长或芽痕标记。母细胞再生长后还可以再一次使用 MACS 分离系统分离（**注释 7**）。

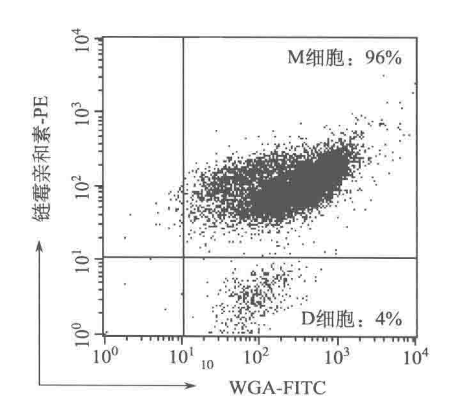


图 18.2　磁性分选后母细胞的纯度。2.5×10^7 个处于对数生长期的生物素化的 INVSc-1 母细胞在 SD 培养基中培养至第 7 代，磁性分选母细胞（转载自**参考文献 *14***，Elsevier 授权许可）

（4）利用链霉抗生素蛋白与生物素的高亲和力特异性结合，荧光标记 MACS 系统分选出的母细胞以检验其纯度。将 3 μL 链霉抗生素蛋白-R-藻红蛋白（PE）溶于 1 mL PBS 中，对约 10^7 个生物素化的母细胞室温下避光染色 1 h。用 PBS 洗细胞 2 次，接着将细胞重悬于 2 mL PBS 中。这些细胞可以用来进行 FACS 分析。在我们的实验中，子细胞杂质占细胞总数的比例低于 4%。结果示例如**图 18.2** 所示。

18.3.3　以芽痕染色为基础分选老化母细胞

细胞表面积累富含几丁质的芽痕环是出芽酵母细胞衰老的典型标志（***17***）。为了观察到芽痕，往往使用高浓度荧光增白剂 M2R 对酵母细胞进行染色。但 M2R 除了与几丁质结合，还与细胞壁的其他部分结合，因此对芽痕不具有特异性。另外，高浓度的荧

光增白剂会影响细胞存活。WGA 能够与几丁质聚合物高特异性结合，并且由于分子质量较大，不能够透过细胞壁，因此，将 WGA 与荧光染料偶联特异性标记芽痕。同时使用 WGA-FITC 对芽痕染色以及链霉抗生素蛋白与 R-PE 偶联对生物素特异性染色以区分母细胞和子细胞杂质。使用流式细胞仪双色荧光法识别双重染色的母细胞（FITC 绿色，PE 橙色），而子细胞仅能被 WGA-FITC 染色。

（1）将 1×10^7 个母细胞与 12 μL WGA-FITC（1 mg/mL）和 3 μL 链霉抗生素蛋白-PE 在 1 mL PBS 中室温避光孵育 1 h。用 PBS 洗细胞 2 次以除去未与细胞结合的标记物。用 2 mL PBS 重悬细胞至细胞浓度为 0.5×10^7 个细胞/mL。

（2）未被染色的细胞及单染色的细胞设置参数。使细胞悬液通过流式细胞仪并观察正向和直角光散射点图（log/log）。进行正向光散射（FSC-H）和直角光散射（SSC-H）的增益调整，使酵母细胞群位于屏幕中央（**图 18.3A**）。

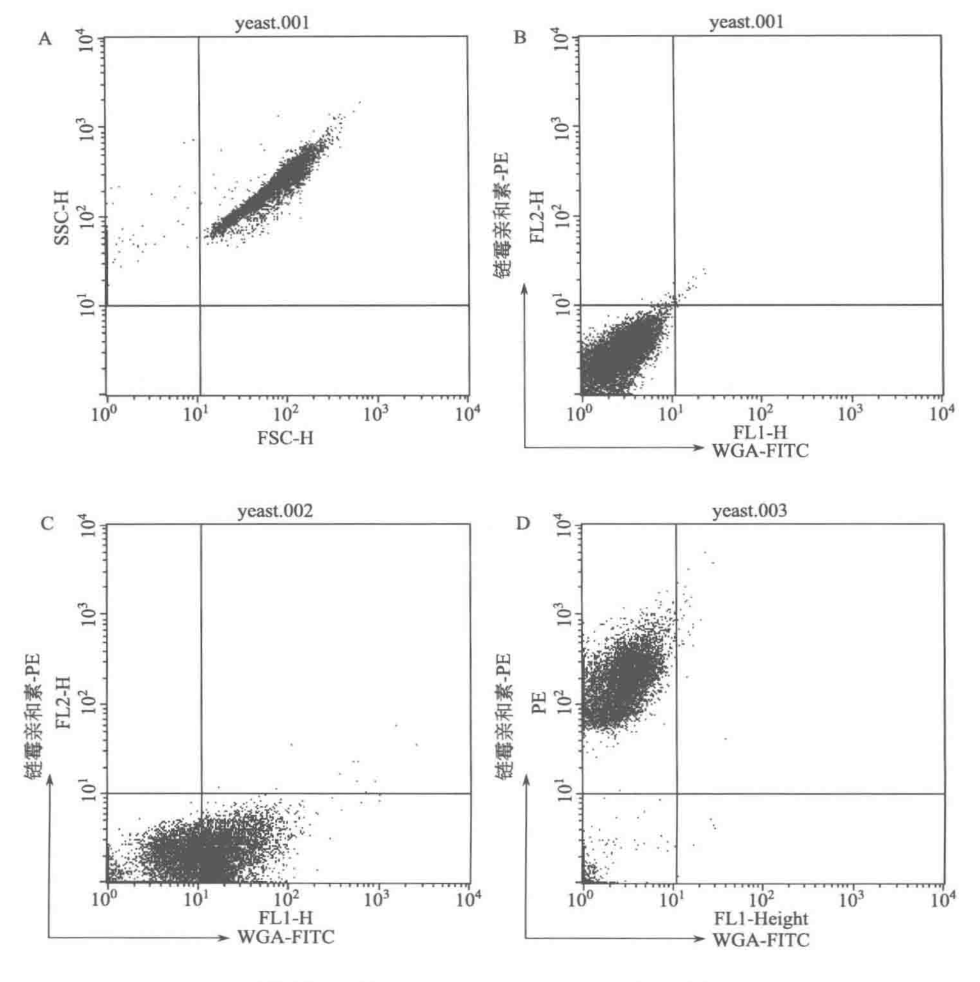


图 18.3 酵母细胞的荧光激活细胞分选分析

（A）正向光和直角光散射用于定位酵母细胞群；（B）低水平异硫氰酸荧光素（FITC）和藻红蛋白（PE）信号的未染色的酵母被调整到角落；（C）FITC 染色的酵母细胞；（D）PE 染色的酵母细胞

（3）用未被染色的细胞流过仪器时，作 FL1-H 对 FL2-H 的点图（log/log）。增加（或减少）FL1 和 FL2 上的高压，使未被染色的细胞位于左下角（**图 18.3B**）。

（4）分别检测 FITC 或 PE 单染色的细胞，以避免这两个通道之间的任何光谱补偿（**图 18.3C，图 18.3D**）。

（5）FACS 分析会识别出双重染色的母细胞。荧光染料（FITC）局限在芽痕环，在细胞壁的其他部位几乎不能被检出。流式细胞仪检测出的荧光信号强度与每个细胞上的芽痕数量相关。芽痕染色的示例如**图 18.4** 所示。

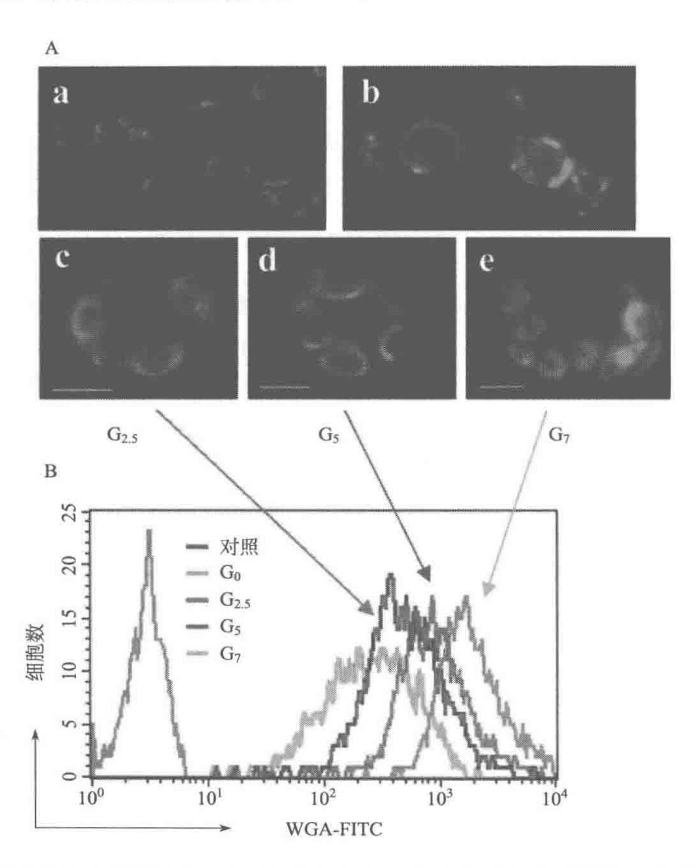


图 18.4 酵母细胞的芽痕染色。在 SD 培养基中培养生物素化的 INVSc-1 细胞（母细胞）磁性分选 G_0、$G_{2.5}$、G_5 和 G_7 世代阶段的母细胞

（A）对不同时期酵母细胞芽痕进行小麦胚芽凝集素（WGA）-异硫氰酸荧光素（FITC）染色，用 Zeiss LSM410 共聚焦显微镜观察（标尺＝1 μm）。(a) 和 (b) 分别为 $G_{2.5}$（第 2.5 代）和 G_7（第 7 代）酵母细胞上 WGA-FITC 染色的芽痕；(B) 不同时期母细胞 WGA-FITC 直方图叠加，显示出荧光随细胞变老而增强。使用未染色的样品作为对照（转载自**参考文献 *14***，Elsevier 授权许可）

（6）FITC 信号很强的母细胞代表了有大量芽痕的细胞群，分选器能够分离并收集带有特定数量芽痕的细胞。收集老化母细胞的门控设置基于两个参数：PE 的荧光强度（区分母细胞和子细胞）、FITC 荧光强度（能够挑选出芽痕数量较多的细胞）（**注释 8**）。

收集分选出的母细胞，涂于 YBD 平板上。30℃孵育 2～3 天后能够观察到独立的菌落。这些菌落潜在地拥有较长的复制寿命，能够被保存供进一步研究。示例如**图 18.5** 所示。

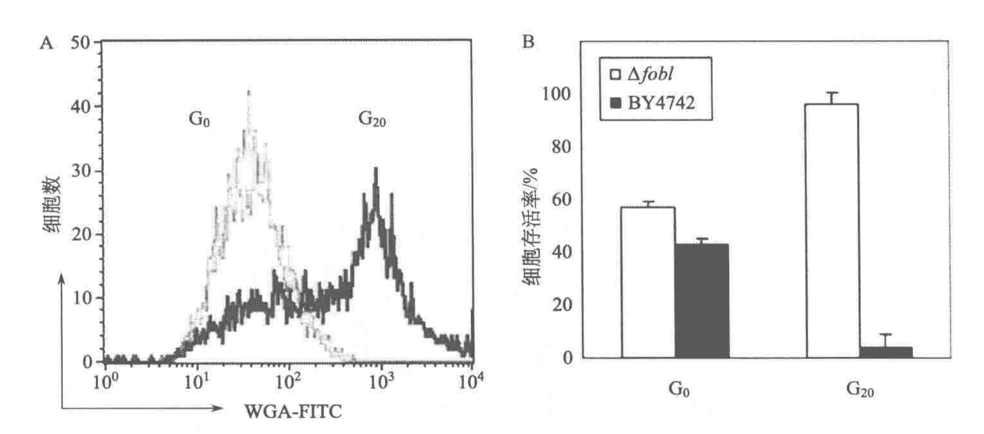


图 18.5 酵母 Δ*fobl* 品系的芽痕分选。众所周知，破坏 *FOBl* 延长酵母寿命（***19***）。混合等量的 Δ*fobl* 和 BY4742 细胞（共 2×10^7 个），生物素标记，并作为母细胞接种物在 SD 培养基中生长。在 BSS 步骤后，在含有遗传霉素和不含遗传霉素的 YPD 平板上精确测定混合培养物在不同阶段 Δ*fobl*（带有遗传霉素选择性标记）与 BY4742 母细胞的比例。三轮磁性分选和再生长周期后，得到第 20 代的母细胞（G_{20}）。麦胚凝集素（WGA）-异硫氰酸荧光素（FITC）染色显示，培养开始时（G_0），混合母细胞群中两个品系的细胞近似等量，而在第 20 代时（G_{20}），母细胞主要是 Δ*fobl*（96%）。这清楚地表明 BSS 通过基于芽痕数目的细胞选择，可以有效地选出寿命较长的细胞。(A) G_0 和 G_{20} 的母细胞 WGA-FITC 直方图叠加；(B) 母细胞循环到 G_{20} 时，Δ*fobl* 频率增加（转载自**参考文献 *14***，Elsevier 授权许可）

18.4 注释

(1) 准备无菌培养基在基因操纵中很重要。含葡萄糖的培养基，尤其是 YPD，可能过度加热，因此高压灭菌时间应少于 25 min，在压力下降之后立即取出培养基以避免出现深棕色。

(2) 酵母细胞在 YPD 培养基中的生长速度远大于在基本培养基中的生长速度。随着细胞浓度的增长，营养供给缩减，细胞分裂速率减缓。细胞浓度达到 5×10^7～10×10^7 个/mL 时，酵母培养达到饱和，细胞进入稳定期（或 G_0 期）。使母细胞维持在指数生长（或对数生长）非常重要。通气量、溶解氧、二氧化碳浓度、温度、pH 都会影响酵母的生长。一般来说，这些参数的作用与酵母品系有关，因此必须单独考虑每个品系的情况。为确保良好的通气，酵母培养基不得超过培养瓶总体积的 1/5，培养时需摇动。

(3) 对母细胞的操作不要求完全同步，因为母细胞代数的不同并不影响最终对长寿母细胞的分选和收集。

(4) Smeal 等 (***18***) 成功证明了将初始母细胞生物素化能够分离出母细胞，但存活率较低，复苏能力较差。为解决这一问题，我们对其中的一个重要环节进行了改进，使用直径 50 nm 的微珠。微珠尺寸较小，不影响细胞的生理特征，因此不需解离。磁性分选收集的带有微珠的细胞接下来在液体或固体培养基中的再生长作为对照组。

(5) 细胞在被上样至 LS 柱之前需要完全重悬。使用细胞滤器 (70 μm Nylon，cat no. 352350；Becton Dickinson Labware，www. bd. com/labware)。

(6) 根据生物素化细胞的数量选择具有最大分离母细胞能力的 MACS 分离器和分离柱。这里我们使用的 MidiMACS 和 LS 柱，能够从多达 2×10^9 个细胞中正向选择并分离出 10^8 个 MACS 微珠标记的细胞。

(7) 在接下来的生长中，初始被标记的母细胞占总细胞的比例在每一代中呈指数下降。例如，20 代之后细胞总数增加 2^{20} 倍。为了使母细胞在最优化的、非稳定期的状态达到尽可能多的细胞周期，需要很大的培养体积，但这实际上很难实现。因此，生长周期数达到中间值 (通常为 7) 时，使用与带有生物素结合部分 (如链霉素结合蛋白或抗体) 偶联磁性微珠收集母细胞，接着将收集起来的母细胞置入新鲜培养基使其再生长。向培养中加入直径 50 nm 的抗生物素磁性微珠纯化母细胞。定期筛选生长至 7 代的母细胞，这个方法在生长速率、筛选效率以及细胞存活率方面都获得了很好的效果。

(8) 在每次实验中运行 FACS 分析测试很必要。运行测试之后，设置门控使其从原有的 3×10^7 个母细胞中收集 100～1000 个。FACS 分析显示了在一定荧光强度下的事件数 (细胞数)。同时采用死细胞染色 (如碘化丙啶) 可以量化死细胞所占的比例。

致谢

感谢 Dr. Amin Bredan 编辑原稿。感谢 Ghent 大学 Concerted Research Action 的支持，Scientific Research-Flanders 的基金，以及 European Commission。

参 考 文 献

1. Guarente, L. and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**, 255-262.
2. Gershon, H. and Gershon, D. (2000) The budding yeast, Saccharomyces cerevisiae, as a model for aging research: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* **120**, 1-22.
3. Jazwinski, S. M. (2001) New clues to old yeast. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 865-882.
4. Tissenbaum, H. A. and Guarente, L. (2002) Model organisms as a guide to mammalian aging. *Dev. Cell* **2**, 9-19.
5. Jarolim, S., Millen, J., Heeren, G., Laun, P., Goldfarb, D. S., and Breitenbach, M. (2004) A novel assay for replicative lifespan in Saccharomyces cerevisiae. *FEMS Yeast Res.* **5**, 169-177.
6. Jazwinski, S. M. (2005) Yeast longevity and aging—the mitochondrial connection. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 243-248.
7. Kaeberlein, M., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005) Genes determining yeast replicative life span in a long-lived genetic background. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 491-504.
8. Kaeberlein, M. and Kennedy, B. K. (2005) Large-scale identification in yeast of conserved ageing genes. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 17-21.

9. Longo, V. D. and Finch, C. E. (2002) Genetics of aging and diseases: from rare mutations and model systems to disease prevention. *Arch. Neurol.* **59**, 1706-1708.

10. Desmyter, L., Dewaele, S., Reekmans, R., Nystrom, T., Contreras, R., and Chen, C. (2004) Expression of the human ferritin light chain in a frataxin mutant yeast affects ageing and cell death. *Exp. Gerontol.* **39**, 707-715.

11. Fry, R. C., Sambandan, T. G., and Rha, C. (2003) DNA damage and stress transcripts in Saccharomyces cerevisiae mutant sgs1. *Mech. Ageing Dev.* **124**, 839-846.

12. Sherman, M. Y. and Muchowski, P. J. (2003) Making yeast tremble: yeast models as tools to study neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Med.* **4**, 133-146.

13. Cobb, J. A., Bjergbaek, L., and Gasser, S. M. (2002) RecQ helicases: at the heart of genetic stability. *FEBS Lett.* **529**, 43-48.

14. Chen, C., Dewaele, S., Braeckman, B., et al. (2003) A high-throughput screening system for genes extending life-span. *Exp. Gerontol.* **38**, 1051-1063.

15. Balaban, R. S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.

16. Ballou, C. E. (1982) The yeast cell wall and cell surface, in (Strathern JN, Jones EW, Broach JR, eds). *The Molecular Biology of the Yeast* Saccharomyces: *Metabolism and Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY: pp. 335-360.

17. Cabib, E. and Bowers, B. (1971) Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *J. Biol. Chem.* **246**, 152-159.

18. Smeal, T., Claus, J., Kennedy, B., Cole, F., and Guarente, L. (1996) Loss of transcriptional silencing causes sterility in old mother cells of S. cerevisiae. *Cell* **84**, 633-642.

19. Defossez, P. A., Prusty, R., Kaeberlein, M., et al. (1999) Elimination of replication block protein Fob1 extends the life span of yeast mother cells. *Mol. Cell* **3**, 447-455.

第19章　老年学研究中DNA微阵列技术的应用

Application of DNA Microarray Technology to Gerontological Studies

Sergey V. Anisimov

摘要　微阵列技术作为分子生物学的新工具，它的出现使得包括老年学在内的许多生物医学学科取得了重大进展。cDNA微阵列和基于寡核苷酸的DNA微阵列都广泛地用于确定衰老的基本生理机制以及揭示抗衰老药物生物作用的分子机制。本章详细讲述两种不同的方法，包括带有放射性或非放射性（荧光）标记的cDNA和寡核苷酸微阵列平台。这些深入的方法也为日常使用DNA微阵列的技术方面提供了背景。

关键词　微阵列技术；cDNA微阵列；寡核苷酸微阵列；放射性标记；荧光标记

19.1　引言

微阵列技术作为分子生物学的新工具，它的出现使得许多生物医学学科取得重大进展（*1*）。尽管尚未建立对微阵列类型的分类，普遍接受的观点是DNA微阵列可以分成两类。cDNA微阵列（印在载玻片或尼龙滤膜上）依靠收集通常含有500～2000个核苷酸插入的细菌克隆，而寡核苷酸微阵列依靠印在固体表面的20～25个到70～80个核苷酸长的合成分子。这两种DNA阵列形式都有各自的优缺点，包括与建立平台的相关费用和便利性、探针合成以及杂交过程。寡核苷酸阵列依靠生物物理学优化的序列。寡核苷酸克隆以恒定浓度点在阵列膜两侧，提供重复性好且准确的量化数据。另外，长cDNA序列的使用减少无关序列的交叉杂交的出现，尽管cDNA微阵列耗费更多人力，在某些应用中也可能是优先选择的方案。依靠极长的寡核苷酸的新兴微阵列类别可能是下一个10年选择的研究方法。类似地，放射性标记和荧光标记都有各自的优缺点。放射性标记高效，也相对便宜，而且必要的话可以将薄膜剥去并重新标记。荧光标记能够同时执行双色杂交（如实验组与对照组），而且比放射性标记更为安全，因而吸引了许多研究人员。重要的是，目前市场上有多种DNA微阵列平台，并且可以定制设计，提供了多元化的选择（**2**）。

在短短的几年中，许多技术进步发展了DNA微阵列技术。之前的DNA微阵列只含有数百个DNA材料点，而现在包含了数以万计的DNA材料点，达到真正的基因组规模（*3*，*4*）。在一些老年学的研究中，DNA微阵列被证实是一个强大的高通量基因表达分析工具。一些研究将重点集中于确定衰老的基本生理机制（*5*～*8*），而其他一些

研究旨在揭示抗衰老药物生物作用的分子机制（***9～11***）。DNA 微阵列的应用可能发现新的预后标志和治疗靶点，最终将大大增进对衰老机制的理解。本章不涉及 DNA 微阵列平台的建立和数据分析的原理，以下的方法非常详细地介绍了 DNA 微阵列的实际操作。

19.2 材料

19.2.1 基于尼龙滤膜的 cDNA 微阵列杂交，放射性标记

（1）MicroHyb 溶液（Research Genetics）。

（2）小鼠 Cot1 DNA（Invitrogen）；－20℃保存。

（3）poly（A）RNA（Amersham Pharmacia），用 pH 7.5 的 10 mmol/L Tris-HCl 复原至 50 μg/μL；分成等份，－20℃保存。

（4）高纯度 Oligo（dT）$_{12\text{-}18}$引物（500 ng/mL）。

（5）RNasin 核糖核酸酶抑制剂（Promega）。

（6）SuperScript Ⅱ逆转录酶（Invitrogen），添加 0.1 mol/L 二硫苏糖醇（DTT）和 5×第一缓冲液。

（7）dNTP（Amersham Pharmacia）：100 mmol/L 储备液，使 dH_2O 稀释至 0.5 mol/L（100 mmol/L dATP、dGTP 和 dTTP 各取 1 μL，加入 197 μL 水）；－20℃保存。

（8）[α^{33P}] dCTP 10 mCi/ml（Amersham Pharmacia）（**注释 1**）。

（9）2×SSC＋0.1％十二烷基硫酸钠（SDS），1×SSC＋0.1％ SDS，0.8×SSC＋0.1％ SDS 溶液。使用 20×枸橼酸钠盐（SSC）缓冲液和 20％ SDS 储备溶液配制。

（10）MicroSpin G-25 或 G-50 柱（Amersham）。

（11）1 mol/L Tris-HCl（pH 7.5），0.5 mol/L 乙二胺四乙酸（EDTA），0.1 mol/L NaOH 溶液。

（12）荧光屏（Molecular Dynamics）。

（13）闪烁计数器（Beckman LS5801，或类似仪器）。

（14）盖革计数器（United Nuclear，或类似仪器）。

19.2.2 寡核苷酸微阵列杂交，荧光标记

（1）低 RNA 输入荧光线性扩增试剂盒（Agilent Technologies）。试剂盒包括合成荧光 cRNA 所需试剂，包括酶、缓冲液等。－20℃保存。

（2）花青 3-CTP（Cy3）和花青 5-CTP（Cy5）（Perkin-Elmer）。4℃避光保存（**注释 2**）。

（3）RNeasy Mini-试剂盒（Qiagen）。试剂盒含有 RNeasy mini 柱和必需的试剂。

（4）Pronto！通用杂交试剂盒（Corning）。试剂盒含有预杂交、微阵列杂交和杂交后洗涤所需的试剂。需要按如下步骤提前准备好洗涤溶液（1）～（3）：

（a）洗涤溶液 1：按顺序混合 1074 mL dH_2O，120 mL 通用洗涤试剂 A，6 mL 通用洗涤试剂 B，分成 500 mL 等份。

(b) 洗涤溶液 2（准备两个 2 L 的瓶子）：按顺序混合 1710 mL dH_2O，90 mL 通用洗涤试剂 A。

(c) 洗涤试剂 3（准备两个 2 L 的瓶子）：按顺序混合 360 mL 洗涤试剂 2 和 1440 mL dH_2O。

(5) 紫外交联仪（UVP）。

(6) 杂交槽（Corning）；每次杂交之后需清洗，杂交之前用 RNase AWAY（Invitrogen）和 70%乙醇清洗。

19.3　方法

由于可用的 DNA 微阵列平台的多样性，任何现有方案或试剂都不能认为在每个 DNA 微阵列中"通用"。相反，在微阵列实验的每一步中经常会对基本方法，如样品标记、预杂交、杂交以及杂交后洗涤加以调整（***12***）。接下来详细介绍两个不同的方法，带有放射性或非放射性（荧光）标记的 cDNA 微阵列平台和寡核苷酸微阵列平台，这为 DNA 微阵列日常工作提供了技术方面的背景（**图 19.1**）。

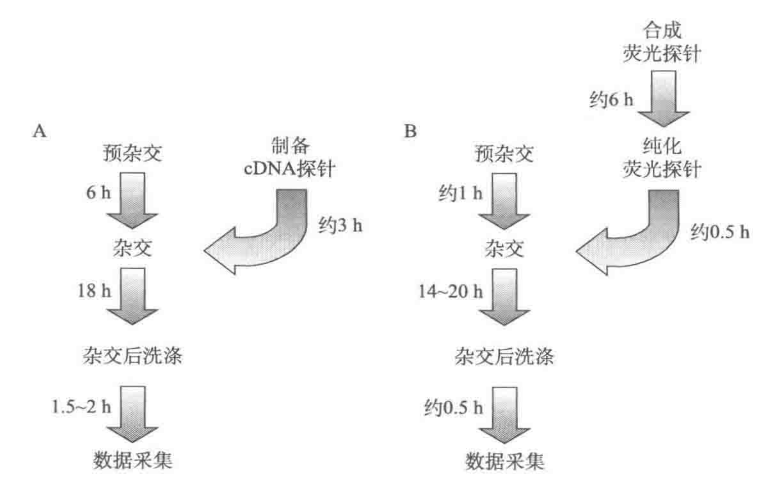


图 19.1　文中方法主要步骤的流程图

(A) 放射性标记的 cDNA 微阵列；(B) 荧光标记的寡核苷酸微阵列

RNA 的质量是微阵列实验成功的关键，在采用下述的方法之前，需要尽量确认 RNA 的质量。在 RNA 纯化和处理的所有步骤中使用焦碳酸二乙酯（DEPC）处理过的塑料制品、气溶胶屏障吸头和一套专用的移液器；经常用 RNase AWAY（Invitrogen）处理工作台表面和手套；必要时使用处理 RNA 专用的房间或通风橱。尽管 RNA 的合成（包括线粒体 RNA）随着衰老而下降（***13***），从大多数样品中纯化微阵列应用所需的总量的 RNA 没有任何实际困难。必要时使用微量样品 RNA 分离技术（如 Rneasy Micro 试剂盒，Qiagen，或类似试剂盒），再进行 RNA 扩增。

在DNA微阵列实验的许多步骤中，计时非常重要。例如，荧光标记寡核苷酸微阵列杂交步骤中，如果预浸时间低于或超出了建议的20 min，杂交信号将显著减少。这个问题在同时处理很多微阵列膜或玻片时需要尤其注意。因此，强烈建议研究人员一次处理不超过1～3个微阵列。

在实验设计和实验结果统计方面没有终极的"黄金标准"。因此，每次实验应根据DNA微阵列平台的大小和样品数量等做出特定的细节上的调整（***14***，***15***）。此外，不同实验室采用不同的数据采集技术方法（扫描仪型号，可用的软件等）和数据分析中优先使用的数学方法。因此以下方法的相应步骤中将不赘述细节，并完全以目标为导向。微阵列实验数据的数学/统计学分析是一个争论不休的话题，每种情况下可以考虑很多数据分析的选择（***16～18***）。已经发现，与不同平台之间的偏差相比，不同实验室之间的偏差对微阵列数据准确性和精度的影响更大（***19***）。目前正在发展标准化的精度评估和统计分析的方法，能够提高结果重现性。总之应该提出的是，应使用不同的方法，如传统逆转录（RT）-PCR技术、实时PCR（Q-PCR）或其他技术对微阵列杂交结果进行验证。建议检测代表不同表达水平或表达变化的有限数目（10～20个），将检测出的趋势与微阵列分析中观察到的相比较，吻合程度一般表明了微阵列实验的质量。

19.3.1　基于尼龙滤膜的cDNA微阵列杂交，放射性标记

1. 预杂交

（1）42℃预热MicroHyb溶液，间歇性地搅拌，完全透明时即可使用（预热可能需要3～4 h）。

（2）煮Cot1 DNA（1 mg/mL）和poly（A）RNA（50 μg/μL）2 min使其变性，置于冰上冷却2～3 min。

（3）将微阵列膜置于50 mL 2×SSC溶液中，室温孵育3 min使其再水化。

（4）将10 mL预热的MicroHyb溶液与250 μL变性的Cot1 DNA（1 mg/mL）和5 μL变性的poly（A）RNA（50 μg/μL）混合。

（5）用镊子将再水化的微阵列膜置于杂交槽中，加入预杂交混合物（**注释3，注释4**）。

（6）在旋转杂交槽中42℃预杂交微阵列膜6 h。

2. 准备cDNA探针

（1）将全部RNA样品（20 μg）稀释或浓缩至16 μL。

（2）加入2 μL oligo（dT）$_{12\text{-}18}$引物（500 ng/μL）。

（3）72℃孵育10 min。

（4）室温孵育30 min。

（5）在冰上按顺序加入以下试剂，用移液器轻轻吹吸以混合：

8 μL 5×第一缓冲液

4 μL 0.1 mol/L DTT（**注释 5**）
4 μL dNTP（每种 0.5 mmol/L，不加 dCTP）
1 μL RNasin（40 U）
2 μL SuperScript Ⅱ逆转录酶（400 U）
5 μL [α^{33P}] dCTP 稀释液（总浓度 50 μCi）（**注释 1**）。

（6）42℃孵育 1 h。

（7）加入 2 μL SuperScript Ⅱ逆转录酶（400 U）。

（8）42℃孵育 1 h。

（9）加入 5 μL 0.5 mol/L EDTA 和 10 μL 0.1 mol/L NaOH 终止反应，用移液器轻轻吹吸以混合。

（10）65℃孵育 30 min。

（11）加入 25 μL 1 mol/L Tris-HCl（pH 7.5）抑制反应。

（12）准备 MicroSpin G-50 柱（每个探针使用 1 个）或 G-25 柱（每个探针使用 2 个）：简单振荡，打开盖子，打破柱底。接着 3000 r/min 离心 1 min。

（13）使用 MicroSpin 柱 3000 r/min 离心 2 min，从标记的 cDNA 探针中除去未结合的核苷酸。

（14）向闪烁小杯加入 1 μL 已过滤的探针和 10 mL 闪烁液。用闪烁计数器测量 cpm 值。

（15）用总 cpm 值估计标记的效率。此外，cpm 值也可以用来将探针体积归一化，使平行试验中的总计数相等。也可以调整杂交混合物的体积以补偿探针的低 cpm 值（**注释 6**）。

3. 杂交

（1）煮 2 min Cot1 DNA（1 mg/mL）和 poly（A）RNA（50 μg/μL）使其变性并标记探针。置于冰上冷却 2～3 min。

（2）将所需体积（10 mL 或更少）的新鲜 MycroHyb 溶液预热至 42℃，与 250 μL 变性的 Cot1 DNA（1 mg/mL），5 μL 变性的 poly（A）RNA（50 μg/μL），及所需体积的探针混合。

（3）从杂交槽中弃去预杂交混合物，以含变形的探针/Cot1/poly（A）的新鲜 MicroHyb 溶液替代。

（4）置于旋转杂交槽中 42℃，18 h，使探针与微阵列膜杂交。

4. 杂交后洗涤

（1）50℃预热洗涤溶液（2×SSC+0.1% SDS，1×SSC+0.1% SDS，0.8×SSC+0.1% SDS）至少 30 min。

（2）弃去杂交混合物（**注释 1 和注释 4**）。

（3）动作迅速，用少量（5 mL）预热至 50℃的 2×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交槽 4 次。

(4) 将杂交罩的温度设定为 50℃。

(5) 用 25 mL 预热至 50℃的 2×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交膜 15 min。

(6) 再次用 25 mL 预热至 50℃的 2×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交膜 15 min。

(7) 用镊子从杂交槽中取出膜，放在置于平面上的保鲜膜上。用盖革计数器检查膜的放射性（**注释 3** 和**注释 7**）。

(8) 用 25 mL 预热至 50℃的 1×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交膜 15 min。

(9) 再次检查膜的放射性（**注释 7**）。

(10) 再次用 25 mL 预热至 50℃的 1×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交膜 15 min。

(11) 再次检查膜的放射性。必要时再用 25 mL 预热至 50℃的 1×SSC+0.1% SDS 溶液洗涤杂交膜 15 min，最多洗涤 2 次。

(12) 立即将杂交膜置于保鲜膜覆盖的硬塑料或荧光屏镜面上（印迹一面朝上）。将沾有少量 2×SSC+0.1% SDS 溶液的洁净 Kimwipe 纸巾置于薄膜旁边以避免干燥。用干燥滤纸吸去过量的洗涤溶液。

(13) 用一张保鲜膜覆盖薄膜和湿纸，轻刷表面除去所有气泡。用纸胶带小心将保鲜膜与“背景”塑料片黏合。使覆盖在表层的保鲜膜带有一定张力，以确保很好地装配（**图 19.2**）。

(14) 将装配好的含有杂交膜的“三明治”正面朝上置于曝光室中，覆盖朝下的存储荧光屏（**注释 8**）。

(15) 锁上曝光室，标记日期。

(16) 室温下将杂交膜在存储荧光屏下曝光 5 天。

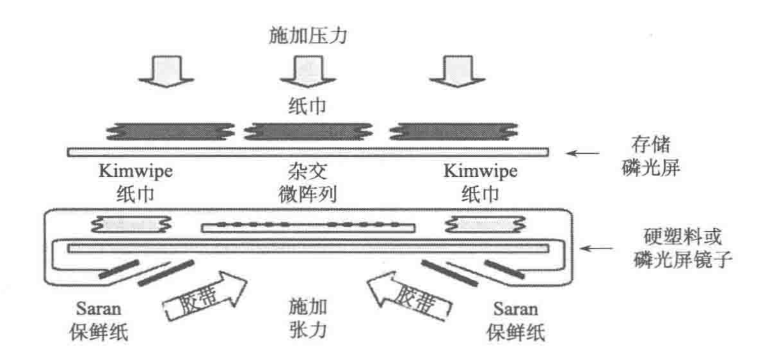


图 19.2 杂交并洗涤在荧光存储屏下曝光用的微阵列膜。用保鲜膜包上硬塑料或荧光屏镜子，将微阵列膜置于其上，印迹面朝上。将几片蘸有少量 2×SSC+0.1% SDS 溶液的 Kimwipe 纸巾置于薄膜旁。用另一张 Saran 保鲜纸覆盖微阵列膜，并用纸胶带将有一定张力的保鲜纸固定在塑料基座背面。在曝光室中，将擦除的荧光屏（朝下）放在组装好的“三明治”上，关闭曝光室之前放上一些纸巾以增加压力

5. 数据采集和分析

(1) 使用荧光显影仪（如 Molecular Dynamics STORM PhosphorImager）扫描曝

光过的存储荧光屏，设定在最高分辨率（50 μm/像素；**图 19.3 和注释 9**）。

（2）用软件包将微阵列图像格式化并分析［如使用 ImageTools（Amersham），使用 ImageQuant（Amersham）或 ArrayPro（Media Cybernetics）］采集数据并消减背景。

（3）必要时，可以将杂交膜（在保鲜膜中保存，保持湿润）重新曝光在擦除的存储荧光屏下，根据^{33}P 的半衰期（25.4 天）以及放射性核素标记探针的参照（处理）日期调整曝光时间。

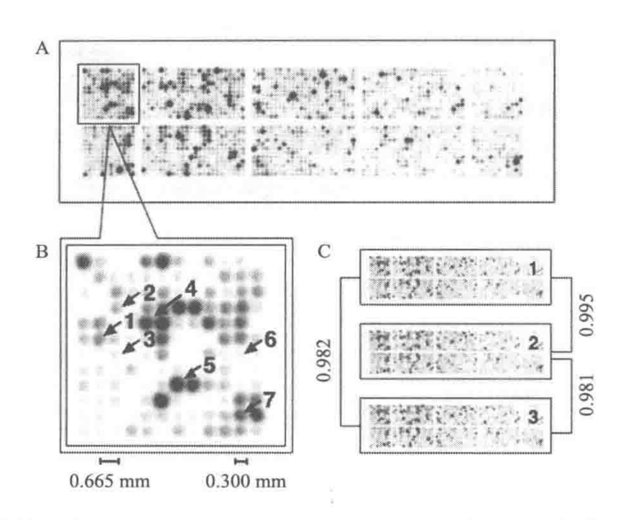


图 19.3　（A）中等规模（2304 个克隆）cDNA 微阵列（NIA 15K，滤膜 C），与成年小鼠心脏来源的放射性探针杂交；（B）A 图中一格的放大（144 个克隆），探测被标记的克隆的表达水平。1. 谷胱甘肽合成酶 A1，任意点值（背景消减后）＝10 564；2. G 蛋白信号调节器（Rgs2），4660；3. 骨髓细胞白血病序列 1（Mcl1，Eat），1373；4. 细胞质型苹果酸脱氢酶（cMDHase），49 585；5. Runt 相关转录因子 2（Runx2，Pebp2a1），68 160；6. 转录因子 Lrg21，1190；7. H1-钙结合蛋白，20 825。刻度：斑点直径为 0.3 mm；斑点中心之间的距离：0.665 mm；（C）相同芯片与单独合成的放射性探针的三重杂交。数字值表示背景消减后，大量任意点值之间的相关系数

19.3.2　寡核苷酸微阵列杂交，荧光标记

1. 荧光探针合成

（1）65℃预热 5×第一链缓冲液 3～4 min；简单振荡，简单旋转，使用前室温存放。

（2）在 0.2 mL 离心管中将全部 RNA 样品（50～200 ng）稀释或浓缩至 10.3 μL。

（3）加入 1.2 μL T7 启动子引物。

（4）65℃孵育 10 min。

（5）置于冰上冷却 5 min。

（6）使用之前，在洁净的离心管中按顺序混合以下试剂，轻轻吹吸以混合（给出的

体积为每个样品所需的量)：

4 μL 5×第一缓冲液

2 μL 0.1 mol/L DTT（**注释 5**）

1 μL 10 mmol/L dNTP 混合物（**注释 10**）

1 μL MMLV RT

0.5 μL RNaseOUT

(7) 向每个样品管中，加入 8.5 μL 上述混合液。

(8) 40℃孵育 2 h。

(9) 65℃孵育 15 min 使 MMLV RT 失活。

(10) 置于冰上冷却 5 min。

(11) 在离心机里简单旋转样品，使凝结物从管壁脱落。

(12) 向每个样品管中加入 2.4 μL 10 mmol/L 花青 3-CTP（Cy3）或 2.4 μL 10 mmol/L花青 5-CTP（Cy5）（**注释 2**）。

(13) 40℃预热 50% PEG 溶液 1 min，简单振荡，简单旋转，使用前室温保存。

(14) 使用之前，在洁净的离心管中按顺序混合以下试剂，轻轻吹吸以混合（给出的体积为每个样品所需的量)：

15.3 μL 除去核酸酶的水

20 μL 4×转录缓冲液

6 μL 0.1 mol/L DTT（**注释 5**）

8 μL NTP 混合物（**注释 10**）

6.4 μL 50% PEG

0.5 μL RNaseOUT

0.6 μL 无机焦磷酸酶

0.8 μL T7 RNA 聚合酶

(15) 向每个样品管中加入 57.6 μL 上述混合物。

(16) 40℃孵育 2 h。

2. 荧光探针纯化

(1) 将反应产物转移至 1.5 mL 离心管中，加入 20 μL 除去核酸酶的水。

(2) 加入 350 μL RLT 缓冲液，用移液器吹吸以完全混合。

(3) 加入 250 μL 96%～100% 乙醇（室温)，用移液器吹吸以完全混合。

(4) 将 700 μL cRNA 样品转移至标记好的内含 RNeasy mini 柱的 2 mL 收集管中。

(5) 4℃，13 000 r/min 离心 30 s（使用冷冻离心机：Eppendorf 5417R，或类似仪器)，弃去流出物，回收柱子。

(6) 将 RNeasy mini 柱转移至新的 2 mL 收集管中，向柱中加入 500 μL RPE 缓冲液。

(7) 4℃，13 000 r/min 离心 30 s，弃去流出物，回收柱子和收集管。

(8) 再次向柱中加入 500 μL RPE 缓冲液。

(9) 4℃，13 000 r/min 离心 1 min，弃去流出物和收集管（**注释 11**）。

(10) 将 RNeasy mini 柱转移至新的 1.5 mL 收集管中。向 RNeasy mini 柱滤膜上直接加入 30 μL 除去核酸酶的水。

(11) 室温孵育 1 min。

(12) 4℃，13 000 r/min 离心 30 s。

(13) 使用相同的 1.5 mL 收集管，直接向 RNeasy mini 柱滤膜上加入 30 μL 除去核酸酶的水。

(14) 室温孵育 1 min。

(15) 4℃，13 000 r/min 离心 30 s。

(16) 小心混合样品（总体积约为 60 μL）。将样品置于冰上，使用除去核酸酶的水作为空白对照，测量荧光掺入（**注释 12**）。置于不透光容器中－80℃ 保存。

3. 预杂交

(1) 42℃预热预浸溶液、预杂交溶液（Corning）并洗涤容器至少 30 min（**注释 13**）。

(2) 将加热板设为 100℃，在烧杯中加热 dH_2O。

(3) 小心用手指拿起载玻片，吸管距离载玻片大约 10 cm，用压缩空气（使用 Memorex 空气除尘器，或类似仪器）吹每个微阵列载玻片。

(4) 小心用手指拿起载玻片（印迹一面朝下），放在沸腾的水上面，直到凝结覆盖载玻片。

(5) 迅速将载玻片置于加热板上，预热至 100℃，印迹一面朝上。凝结消失后迅速将载玻片从加热板上拿走。

(6) 交联时，将载玻片置于紫外炉的转台上，印迹一面朝上。设定能量为 800 mJ/cm^2。

(7) 使用量筒向洗涤容器中加入 100 mL 预浸溶液。向溶液中加入硼氢化钠预浸片，水浴预热至 42℃（**注释 14**）。

(8) 等待 3～4min 使预浸片完全溶解，浸入微阵列载玻片，与洗涤容器一起 42℃孵育 20 min（**注释 4**）。

(9) 将载玻片转移至洗涤溶液 2，室温孵育 30 s。

(10) 将载玻片转移至另一个盛满洗涤溶液 2 的洗涤容器中，室温孵育 30 s。

(11) 将载玻片转移至预热至 42℃的预杂交溶液，42℃孵育 15 min。

(12) 将载玻片转移至洗涤溶液 2 中，室温孵育 1 min。

(13) 将载玻片转移至洗涤溶液 3 中，室温孵育 30 s。

(14) 转移载玻片至另一个盛满洗涤溶液 3 的洗涤容器中，室温孵育 30 s。

(15) 转移载玻片至不含核酸酶的水中。

(16) 立即使用适配器（CombiSlide 载玻片/微阵列适配器，或类似仪器）干燥载玻片，在通用离心机（Sigma 2-5，或类似仪器）中 1200 *g* 离心 3 min。这个步骤中，小心地拿载玻片边缘操作。

（17）使用前将载玻片存放在密闭容器中。

4. 杂交

（1）准备盖玻片（Knittel Gläser，或类似产品）：依次完全浸入无核酸酶的水和异丙醇中，在通用离心机（Sigma 4K15，或类似仪器；**注释 15**）以 500 *g* 的速度离心 2 min。

（2）在 0.2 mL 离心管中合并适当体积的 Cy3 和 Cy5 标记的样品（如实验组和对照组的浓度比分别为 20 pmol∶15 pmol 或 20 pmol∶10 pmol）（**注释 2**）。

（3）使用浓缩器真空干燥合并样品（可能需 20～30 min，依样品的初始体积而定）。在使用之前，样品可以用锡箔纸包好，−20℃保存。

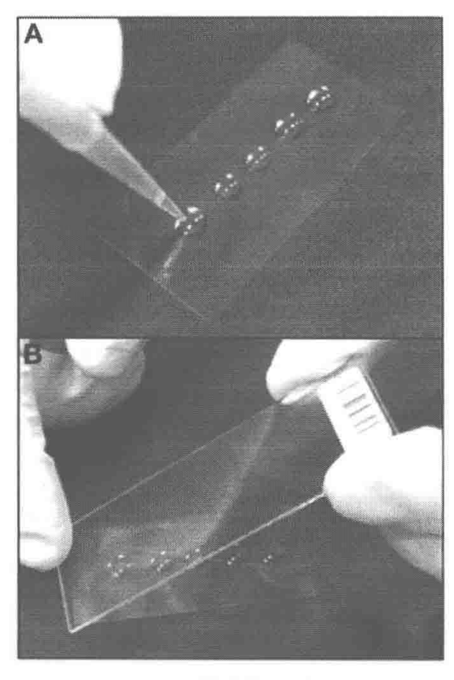


图 19.4　操作微阵列玻片

（A）在盖玻片表面分散在杂交溶液中重悬 Cy3/Cy5 标记的样品；（B）小心将微阵列载玻片印迹一面朝下，放在盖玻片上。调整盖玻片位置，组装杂交槽

（4）将已干燥的 Cy3/Cy5 样品溶解在 50 μL杂交溶液（Corning）中。

（5）65℃孵育 5 min。

（6）10 000 *g* 离心 5 min。

（7）清洁杂交槽（Corning）：先用喷洒有 RNase AWAY（Invitrogen）的 Kimwipe 纸巾擦拭，再用喷有 70%乙醇的 Kimwipe 纸巾擦拭。用洁净的 Kimwipe 纸巾擦干杂交槽。

（8）将杂交槽底部的两个孔装满 12 μL 不含核酸酶的水以避免脱水。

（9）向盖玻片吹压缩空气，置于平整表面上。

（10）小心将 45 μL 离心过的样品滴在盖玻片表面（**图 19.4A**）。使用干燥的移液枪头吸出小气泡。

（11）向载玻片吹压缩空气，印迹面朝下，小心将其放在盖玻片上（**图 19.4B**）。翻转阵列，必要时调整盖玻片位置。样品应完全填满盖玻片和阵列载玻片之间的空间。

（12）不翻转，小心将微阵列玻片置于杂交槽中，装配杂交槽。

（13）杂交探针和微阵列玻片在杂交槽中 42℃水浴 14～20 h，需避光。

5. 杂交后洗涤

（1）42℃预热洗涤溶液 1 并洗涤容器至少 30 min。设定加热板温度为 50℃（**注释 16**）。

（2）在加热板上预热培养皿至 50℃，加入 25 mL 预热至 42℃的洗涤溶液 1。

（3）从水浴中取出杂交槽，用纸巾擦干。不翻转，拆开杂交槽，盖玻片朝上将阵列玻片完全浸于培养皿中。

（4）放在加热板（预热至 50℃）上孵育，直至盖玻片与载玻片完全分离（大约需要 5 min）。

（5）小心从阵列上取下盖玻片，将载玻片转移至装满洗涤溶液 1 的洗涤容器中，42℃孵育 5 min。

（6）将玻片转移至洗涤溶液 2 中，室温孵育 10 min。

（7）将玻片转移至洗涤溶液 3 中，室温孵育 2 min。

（8）将玻片转移至另一个装满洗涤溶液 3 的容器中，室温孵育 2 min。

（9）将玻片转移至另一个装满洗涤溶液 3 的容器中，室温孵育 2 min。

（10）立即离心玻片。使用适配器，1200 *g* 离心 2 min，干燥玻片。

（11）扫描之前将载玻片存放在密闭避光容器中。

6. 数据采集和分析

（1）扫描玻片之前用压缩空气吹玻片。

（2）使用软件包［如格式化使用的 Tiff Image Channel Splitter Utility（Agilent Technologies）］将图像格式化；推荐使用 GenePix Pro（Axon Instruments）软件进行数据采集和背景消减。

（3）必要时可在 1～2 天内再次扫描玻片，此时记录的荧光信号强度通常会降低。在避光容器中保存玻片。

19.4　注释

（1）出于安全考虑，放射性标记的使用受到严格的法规限制。放射性核素应用的所有方面（存储，处理，液体和固体放射性废物处理等）都应按照当地法规进行。始终准确并谨慎地使用放射性核素和放射性标记。只能使用专用的一套移液器，特别标记的离心机、水浴、移液器吸管等。始终在指定的区域（“热场”）工作，并使用个人防护装备（防护罩和手套等）。在工作前、工作中以及工作后检查放射性。

（2）花青 3-CTP（Cy3）和花青 5-CTP（Cy5）荧光染料具有高度感光性。每一步都应最大程度减少在光下的暴露，不在直射光下处理样品，水浴时关闭盖子，存储和处理样品时用锡箔包好等。此外，Cy3，特别是 Cy5 对氧化（由环境中的臭氧造成）和潮湿非常敏感。不在空气中风干玻片（如使用自动杂交工作站，在纯氮气下干燥玻片；Tecan）将大大减少对臭氧的暴露。否则，染料的作用应作为实验设计的一部分进行控制。

（3）小心处理微阵列膜：使用钝头长镊子或尖端用塑料包裹的长镊子。玻片可使用短镊子处理。处理时仅接触膜/玻片的边缘，不要接触中间印有 cDNA 的区域。

(4) 从再水化（预浸）步骤起，确保微阵列膜/玻片一直保持湿润。任何步骤中膜或玻片的干燥将导致背景急剧增加。杂交槽加热时要特别注意膜的状态。

(5) 处理 DTT 时避免反复冻融。一般来说，任何 DTT 分装不应反复冻融 5 次以上。

(6) 得出的 cpm 值可用于所需探针体积的一般归一化。例如，如果探针 1 的 cpm 值是 500 000，而探针 2 为 350 000，二者用于杂交的体积应分别为 56 μL 和 80 μL。可以每次独立调整（如减少）杂交混合物的体积以获得相等的最终探针浓度（cpm/mL）。

(7) 确定盖革计数器已充电并校准，用保鲜膜保护检测器（探头）。探针水平置于杂交膜上方约 1 cm，每次洗涤之后大致检查膜的放射性。当杂交膜在盖革计数器下显示出 10～15 cps 的读数时，就不需要进一步洗涤，可以在存储荧光屏下曝光。

(8) 在曝光杂交膜之前以及扫描之后都应检查存储荧光屏的剩余放射性，用湿 Kimwipe 纸巾擦拭，风干，并清除。

(9) 现代扫描仪的空间分辨率为：(5～50)～(50～250) μm/像素。对大多数放射性标记的 cDNA 微阵列而言，25～50 μm/像素的分辨率较为合适。

(10) 低 RNA 输入荧光线性扩增试剂盒（Agilent Technologies）含有两管 dNTP，分别标记有“在 10 mmol/L dNTP 混合物”和“NTP 组合”。在 19. 3. 2 节中 1. 小节的**步骤（6）**和**步骤（14）**中正确使用这两种试剂。

(11) 建议在 RPE 缓冲液处理的两个步骤都完成之后，延长 RNeasy 列硅胶膜的离心干燥时间［19. 3. 2 节中 2. 小节，**步骤（9）**］。第 7 步后可选择丢弃流出物和收集管，将 Rneasy mini 柱转移至新的 2 mL 收集管中，不关闭管盖，13 000 r/min 离心 1 min。

(12) 荧光掺入量可用下列公式计算：pmol Cy3 $= OD_{550} \times 100/0.15$；pmol Cy5 $= OD_{650} \times 100/0.25$。使用低 RNA 输入荧光线性扩增试剂盒（Agilent Technologies），根据初始材料的量，通常得到每个反应在 3. 5～4. 5 pmol 内的荧光掺入。

(13) 在所有的预浸/预杂交步骤中，100 mL 洗涤容器中的微阵列玻片不超过 6 个。如果处理超过 6 张玻片，每一步需清洁洗涤容器并使用新溶液。

(14) 硼氢化钠（$NaBH_4$，Borol）在潮湿时高度易燃且剧毒，应小心地在通风橱中使用，并使用防护设备。依照当地规定处理硼氢化钠废物。使用前 15 min 之内向预浸溶液中加入硼氢化钠预浸片。如果使用硼氢化钠液体，混合 99 mL 预浸溶液（预热至 42℃）和 1 mL 硼氢化钠溶液，然后立即浸入微阵列玻片。

(15) 盖玻片在离心和处理时很容易打破。提前准备好备用的盖玻片。

(16) 所有的杂交之后的步骤中，100 mL 洗涤容器中的微阵列玻片不超过 3 个。如果处理超过 3 张玻片，每一步需清洁洗涤容器并使用新溶液。

致谢

以上方法以 National Institute on Aging、National Institutes of Health，Baltimore，MD（cDNA 微阵列，放射性标记）的遗传学实验室以及 Swegene（The Postgenomic Research and Technology Programme in South Western Sweden）cDNA 微阵列资源中心，Lund 大学，Lund，Sweden（寡核苷酸微阵列，荧光标记）建立的方法为基础。本

章作者感谢 Kevin Becker 和 William Wood（NIA/NIH），以及 Åke Borg 教授，Eleonor Olsson 和 Johan Staaf（Swegene）提供重要技术帮助，并感谢 Patrik Brundin 教授，Jia-Yi Li 副教授和 Emma Lane 对原稿的严格审查。本工作由 The United States Army Medical Research Acquisition Activity（USAMRAA）No. W81XWH-04-1-0366 拨款、National Institute of Health No. 1 R21 NS043717-01A1、Swedish Research Council Project No. K2002-99SX-14472-01A，以及 Crafoord Foundation and The Research Foundation of the Swedish Parkinson's Disease Association 提供资金支持。

参考文献

1. Choudhuri, S. (2004) Microarrays in biology and medicine. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **18**, 171-179.
2. Enders, G. (2004) Gene profiling-chances and challenges. *Acta Neurochir. Suppl.* **89**, 9-13.
3. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470.
4. Truckenmiller, M. E., Vawter, M. P., Cheadle, C., Coggiano, M., Donovan, D. M., Freed, W. J., et al. (2001) Gene expression profile in early stage of retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Restor. Neurol, Neurosci.* **18**, 67-80.
5. Ida, H., Boylan, S. A., Weigel, A. L., and Hjelmeland, L. M. (2003) Age-related changes in the transcriptional profile of mouse RPE/choroid. *Physiol. Genomics* **15**, 258-262.
6. Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., et al. (2003) Gene microarrays in hippocampal aging: statistical profiling identifies novel processes correlated with cognitive impairment. *J. Neurosci.* **23**, 3807-3819.
7. Hamatani, T., Falco, G., Carter, M. G., Akutsu, H., Stagg, C. A., Sharov, A. A., et al. (2004) Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2263-2278.
8. Park, S. K., and Prolla, T. A. (2005) Lessons learned from gene expression profile studies of aging and caloric restriction. *Ageing Res. Rev.* **4**, 55-65.
9. Anisimov, S. V., Boheler, K. R., Khavinson, V. Kh., and Anisimov, V. N. (2002) Studies of the effects of Vilon and Epithalon on gene expression in mouse heart using DNA-microarray technology. *Bull. Exp. Biol. Med.* **133**, 293-299.
10. Anisimov, S. V., Khavinson, V. Kh., and Anisimov, V. N. (2004) Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide Cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol. Lett.* **25**, 87-93.
11. Jervis, K. M., and Robaire, B. (2004) The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod.* **71**, 1088-1095.
12. Yauk, C. L., Berndt, M. L., Williams, A., and Douglas, G. R. (2004) Comprehensive comparison of six microarray technologies. *Nucleic Acids Res.* **32**, e124.
13. Devi, A., Mukundan M. A., Srivastava, U., and Sarjar, N. K. (1963) The effect of age on the variations of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and total nucleotides in liver, brain and muscle of rat. *Exp. Med. Res.* **32**, 242-250.
14. Lee, M. L., Kuo, F. C., Whitmore, G. A., and Sklar, J. (2000) Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Natl. Acad. Sci. U S A* **97**, 9834-9839.
15. Churchill, G. A. (2002) Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **32 Suppl**, 490-495.
16. Quackenbush, J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 418-427.

17. Cheadle, C., Vawter, M. P., Freed, W. J., and Becker, K. G. (2003) Analysis of microarray data using Z score transformation. *J. Mol. Diagn.* **5**, 73-81.
18. Hackl, H., Cabo, F. S., Sturn, A., Wolkenhauer, O., and Trajanoski. Z. (2004) Analysis of DNA microarray data. *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 1355-1368.
19. Irizarry, R. A., Warren, D., Spencer, F., Kim, I. F., Biswal, S., Frank, B. C., et al. (2005) Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat. Methods* **2**, 345-350.
20. Kargul, G. J., Dudekula, D. B., Qian, Y., et al. (2001) Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set. *Nat. Genet.* **28**, 17-18.

第 20 章　在高等生物中检测和分析 *lacZ* 报告位点——在小鼠和果蝇中的应用

Detection and Analysis of Somatic Mutations at a *lacZ* Reporter Locus in Higher Organisms Application to Mus musculus and Drosophila melanogaster

Ana Maria Garcia，Rita A. Busuttil，Armando Rodriguez，
Carlos Cabrera，Martha Lundell，Martijn E. T. Dolle，Jan Vilg

摘要　在高等动物中检测和分析体细胞突变的方法对于研究体细胞突变在癌症、遗传病以及衰老的因果关系中扮演的角色尤其重要。本章我们详细描述了将含有 *lacZ* 的质粒整合入小鼠和果蝇胚系中的突变报告系统。在一个或多个染色体位点整合入细菌 *lacZ* 基因的质粒可以被切割、纯化、并在合适的允许正向选择突变 *lacZ* 基因的大肠杆菌宿主内回收，进一步研究其分子特性。这个系统既能够检测到 *lacZ* 报告基因上的小突变，也能够检测有一个断点在 *lacZ* 上而另一个断点在基因的其他位置的大规模基因重组。

关键词　体细胞突变；基因重组；*lacZ* 质粒；小鼠；果蝇

20.1　引言

DNA 突变是造成癌症、衰老和遗传病的因素之一（*1*）。DNA 突变不可逆，在不清除细胞的情况下无法修复。特别是大型染色体突变具有毒性，导致基因机能障碍，通过基因计量、移位等作用严重改变基因表达的正常模式（2）。高等生物中的体细胞突变主要用细胞遗传学方法或可选择的目标基因来分析，如外周血淋巴细胞或其他增殖活性高的细胞中的 *HPRT* 基因。这些方法有力地证明了白细胞中的体细胞突变积累随年龄增加，是癌症的一个主要的风险因素。有趣的是，在患有 Werner's 综合征（一种节段性早衰综合征）患者的淋巴细胞中，基因重组的频率明显升高（*3*）。然而在肝脏、心脏、大脑等非增殖性组织中无法检测到随机突变。为解决这一问题，我们开发出带有报告基因的转基因小鼠模型，可以从整合状态回收报告基因，转入大肠杆菌中，并检测其突变情况（*4*）。这些模型之一（**图 20.1**）以含有 *lacZ* 报告基因的质粒为基础，能够检测大范围的体细胞突变，包括大型基因重组（5）。研究贯穿实验动物的一生，以验证突变随着衰老而积累的假说，正如最初衰老的体细胞突变理论所预言的那样（*6*）。研究结果表明，在不同的器官和组织中都有突变的积累，但积累的速率有很大的差别；

而且积累的突变类型在各个器官中也有所不同（*7*，*8*）。有趣的是，随着年龄的增长积累在心脏和肝脏中的突变中的很大一部分（多达50%）是大型基因重组（*9*）。当此类突变的一个断点在质粒集群的 *lacZ* 基因上而另一个断点在小鼠基因组的其他位置时，能够作为缺失、颠倒或易位被 *lacZ* 报告系统检测到（**图 20.1**）。

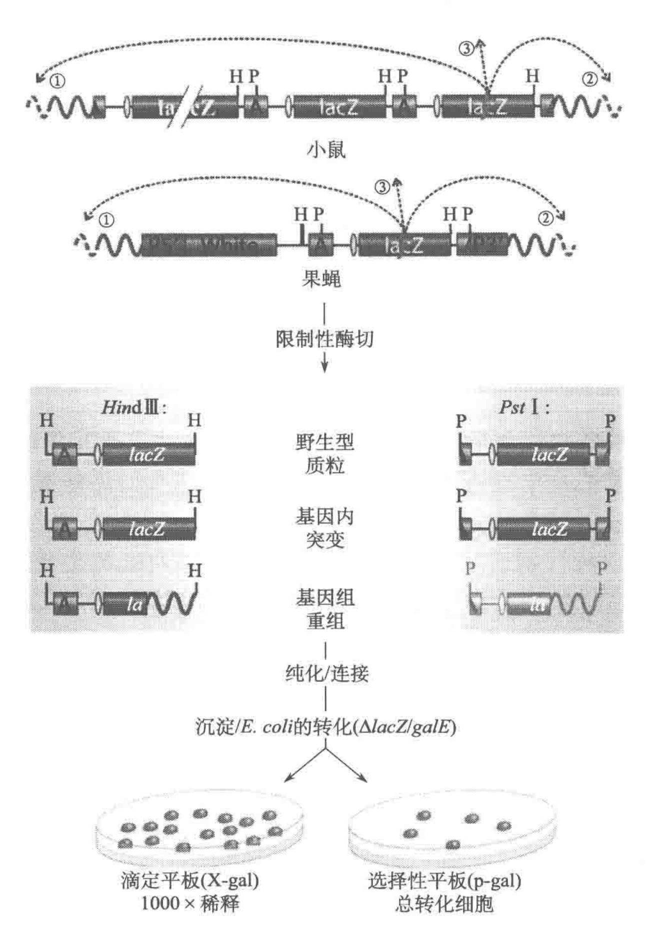


图 20.1　小鼠和果蝇中 *LacZ* 质粒模型示意图。注意小鼠品系在每个整合位点含有大约 10 个或 21 个首尾相接的质粒拷贝，这里只画出 3 个。对于转基因果蝇，每个品系只带有 pUR288 质粒的一个拷贝。用 *Hind* Ⅲ（H）或 *Pst* Ⅰ（P）剪切基因组 DNA 能够回收单独的质粒。对小鼠或果蝇的基因组 DNA 进行纯化、自连接并转入大肠杆菌 C（Δ*LacZ*，*galE*⁻）宿主细胞中后，能够以氨苄西林抗性菌落的形式回收。在含有 X-gal 的培养基的平板上培养少量转化细胞以确定回收质粒总数。其余的细胞在添加乳糖类似物 p-gal 的培养基中培养，以选择带有 *lacZ* 突变的细胞。突变频率为选择平板与滴定平板上的菌落数的比值（乘以稀释倍数）。虚线箭头代表一个在 *lacZ* 报告基因上的假想断点（闪电标记），另一个断点在小鼠基因组整合位点的 5′①或 3′②或其他染色体③上。由于不在 *amp* 基因上的 *Pst* Ⅰ位点的连接不能恢复氨苄西林，只能用 *Hind* Ⅲ酶切来检测基因重组。当复制起始点（黄色椭圆）和氨苄西林抗性基因（A）未被删除时，只有上游截断的质粒序列会在 *Hind* Ⅲ酶切之后产生突变菌落。*LacZ*，*LacZ* 报告基因；P5′=［pP（CaSper）］的 5′端；P3′，［pP（CaSper）］的 3′端；白，白色选择标记

最近在果蝇中开发了与小鼠中的 *lacZ* 突变报告系统十分类似的系统。这一新模型得到的结果与小鼠的结果十分类似，尽管基因重组的频率略高（Garcia 等，已投稿）。

本章描述在小鼠和果蝇的 *lacZ* 报告位点量化并表征所有类型突变的特性。考虑到基因重组对衰老组织的毒性，我们将重点关注基因重组。

20.2　材料

20.2.1　转基因动物

（1）之前报道过用来进行体内突变检测和表征的转入 *lacZ* 质粒的 C57BL/6J 来源的转基因小鼠（***10***，***11***）。转基因位点由一簇头尾相接串联的 pUR288 质粒组成，质粒中整合了完整的带有旁侧 *Hin*d Ⅲ位点的大肠杆菌 *lacZ* 基因。通过显微注射生成若干转基因品系。品系 60 带有约 20 个以头尾相接方式整合入两个分别位于 3 号和 4 号染色体上的位点的质粒拷贝。品系 30 在 11 号染色体上带有 21 个 pUR288 质粒拷贝（***15***）。繁育这两个品系的纯合子。如有需要可以向本章作者索要这两个品系。

（2）最近在果蝇中开发了类似的 *lacZ* 报告系统，能够检测并表征所有类型的体细胞突变（Garcia 等，已投稿）。含有 *lacZ* 报告基因的转基因果蝇品系由 P 因子调控的胚系转化构建。将 *lacZ* 报告基因克隆至 P 因子载体 pCasper，它包含供整合的 P 因子反向重复序列和供正向选择的白色基因的一部分。这个包含转座酶基因的 *lacZ* P 因子载体和 P 因子载体 p（Δ2-3）共同注射进入白色基因缺失的胚胎中。将得到的果蝇与白色不足的果蝇交配，根据后代眼睛的显色筛选成功的转化。p（Δ2-3）主要以 *Stubble* 基因为标志，对这一标志的反向选择确保了转座酶的活性被完全消除。将每只转基因果蝇与白色不足的果蝇交配以产生稳定的带有特定的 *lacZ* P 因子插入的群体。由此产生了若干个不同位置的只带有一个随机插入染色体的质粒的转基因果蝇品系。所有生成的 lacZ 果蝇品系都可以向本文作者索取。

构建的小鼠和果蝇质粒和它们整合入相应基因中后的组织结构以及在大肠杆菌中质粒的回收如**图 1** 所示。

20.2.2　大肠杆菌品系

用来回收质粒的宿主大肠杆菌品系为 *E coli C*，Δ*LacZ*，*galE*⁻。该品系具有卡那霉素耐药性以及半乳糖敏感性。这一品系可以向本文作者索取。

20.2.3　试剂（**注释 1**）

（1）5×偶联缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl（由 1 mol/L 储备液配制，pH 7.5），5 mmol/L EDTA，50 mmol/L $MgCl_2$，25%甘油（*V/V*；31.5 g/100 mL）。使用 HCl 调节 pH 至 6.8，将溶液过滤灭菌。

（2）1×偶联缓冲液：20 mL 5×偶联缓冲液加入 80 mL 超纯水中。

（3）IPTG 储备液：25 mg/mL IPTG（异丙基 *β*-D-硫代半乳糖苷；Sigma）溶于超

纯水中，将溶液过滤灭菌，−20℃保存。

(4) IPTG 洗脱缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl（由 1 mol/L 储备液稀释，pH 7.5），1 mmol/L EDTA，125 mmol/L NaCl。将溶液过滤灭菌，室温保存。

(5) ATP 溶液：10 mmol/L ATP（5′三磷酸腺苷；Sigma）溶于超纯水中。将溶液过滤灭菌，每管 50 μL 分装，−80℃保存。

(6) *Hin*d Ⅲ限制酶：10 U/μL（Roche）。

(7) 限制性内切酶 NE 缓冲液＃2（New England Biolabs）。

(8) 磁性微珠：Dynabeads M-450 羊抗兔免疫球蛋白（Ig）G（4×10^8 个微珠/mL；Dynal，cat. no. 11002）。

(9) 抗 β-半乳糖苷酶单克隆抗体：2 mg/mL（Promega；cat. no. Z3783）。

(10) *LacI*/*LacZ* 融合蛋白（**注释 2**）。

(11) 无 $MgCl_2$ 的磷酸盐缓冲液：GIBCO BRL。

(12) T4 DNA 连接酶：T4 DNA 连接酶（Invitrogen；1 U/μL）溶于 10× T4 DNA 连接酶缓冲液中（Invitrogen）。

(13) 糖原：20 μg/μL 糖原（Roche）。

(14) 乙酸钠：3 mol/L 乙酸钠，pH4.9，溶于经高压灭菌的超纯水。

(15) Luria-Bertani（LB）培养基Ⅰ：LB 肉汤基础培养液（20 g/L Lennox LB 肉汤基础培养液；BD Difco），高压灭菌 20 min（液体 cycle）。

(16) LB 培养基Ⅱ：含终浓度为 5 mmol/L $MgCl_2$ 的 LB 培养基Ⅰ，使用前向培养基中加入 1 mol/L $MgCl_2$ 储备液。

(17) 氯化镁：1 mol/L $MgCl_2$ 溶于经高压灭菌的超纯水。

(18) LB 顶层琼脂：6.125 g/L LB 肉汤基础培养液（BD Difco）和 6.125 g/L 抗生素培养基 2（BD Difco）。加入氯化 2,3,5-三苯-2H-四唑（加入粉末至终浓度为 75 μg/mL；MP Biomedicals），微波加热至完全溶解，接着低火加热 30 min。冷却至 44℃。加入氨苄西林（终浓度 150 μg/mL）、卡那霉素（终浓度 25 μg/mL）、X-gal（终浓度 37.5 μg/mL）或 p-gal。

(19) 卡那霉素：使用 50 mg/mL 溶液（Sigma）。

(20) 氨苄西林：使用溶于超纯水的 50 mg/mL 溶液（Fisher Biotech）。

(21) X-gal：5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷（Gold Biotechnology Inc.，或其他供应商）。使用溶于 *N*,*N*-二甲基-甲酰胺（Sigma）的 50 mg/mL 溶液。

(22) P-gal：0.3%苯基-β-D-半乳糖苷，使用粉末配制（Sigma）。

(23) Lysis 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，pH8.0,；10 mmol/L EDTA；150 mmol/L NaCl（高压灭菌）。

(24) 乙酸钾：8 mol/L 乙酸钾溶于超纯水（高压灭菌）。

(25) X-gal 平板：20 g/L LB 肉汤基础培养液，15 g/L 琼脂。高压灭菌（121℃，20 min），冷却至 50℃加入 25 μg/mL 卡那霉素，150 μg/mL 氨苄西林，75 μg/mL X-gal（浓度均为终浓度）。向每个 15 cm 平板内加入 35 mL 琼脂，37℃避光过夜晾干。将平板包好，4℃避光可存放 1 个月。

(26) TE 缓冲液：10 mmol/L Tris，pH 8.0，1 mmol/L EDTA，pH8.0（高压灭菌）。

(27) 10×M9 盐：58 g/L 无水 Na_2HPO_4，30 g KH_2PO_4，5 g/L NaCl，10 g/L NH_4Cl。

(28) M9CA 培养基（1 L）：100 mL 10×M9 盐和 5 g 酪蛋白氨基酸溶于 870 mL 双蒸水中。高压灭菌并冷却至室温。加入 25 mL 20%（*m*/*V*）葡萄糖，2 mL 硫胺素（0.5 mg/mL，过滤灭菌），1 mL 1 mol/L $MgSO_4$ 以及 1 mL 0.1 mol/L $CaCl_2$。

(29) TY 培养基（1 L）：20 g/L 细菌胰蛋白胨（Difco），5 g/L 酵母提取物（Difco），5.9 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.58 g/L NaCl。

(30) Lysis 溶液（7.5 mL）：0.573 g 盐酸亚精胺，3 mL 5 mol/L NaCl，0.75 g 蔗糖。

(31) Tris-蔗糖缓冲液（TS 缓冲液）：50 mmol/L Tris-HCl，pH7.5，10%（*V*/*V*）葡萄糖。

(32) 含有蛋白酶抑制剂的 Tris-蔗糖溶液（75 mL）：向 75 mL TS 缓冲液中加入 16 μL抑蛋白酶肽（在缓冲液中的浓度为 5 mg/mL），16 μL 亮抑蛋白酶肽（在缓冲液中的浓度为 5 mg/mL），5.2 mg 苯基甲基磺酰氟（PMSF）和 80 μL 胃蛋白酶抑制剂（在缓冲液中的浓度为 1 mg/mL）。

(33) 10×DIANA 缓冲液（100 mL）：25 mL 1mol/L Tris-HCl，pH8.0，30 mL 5 mol/L NaCl，2 mL 0.5 mol/L EDTA，5 mL 1 mol/L $MgCl_2$。高压灭菌，冷却至室温后加入 0.5 mL Tween-20，4℃保存。

(34) 含甘油的 1×DIANA 缓冲液（2 mL）：200 μL 10×DIANA 缓冲液，1 mL 50%甘油，2 μL β-巯基乙醇，800 μL 蒸馏水，－20℃保存。

(35) 10%甘油：向超纯水中加入 12.6 g（10×1.26 g/mL）甘油并高压灭菌。

(36) 50%甘油：向超纯水中加入 63 g（50×1.26 g/mL）甘油并高压灭菌。

20.3　方法

20.3.1　制备电感受态细胞

(1) 在一个 50 mL 离心管中，向 10 mL LB 培养基中加入 50 mL Δ*lacZ*/*galE*⁻ 大肠杆菌品系甘油储备液和 5 mL 卡那霉素。37℃，250 r/min 在 Innova 4000 摇动培养箱（New Brunswick Scientific）中使细胞生长过夜。

(2) 取 4 个装有 500 mL 预先高压灭菌过的 LB 培养基 I 的三角烧瓶，每个烧瓶中加入 1.5 mL 过夜后的培养物。继续摇动培养，温度设为 31.5℃，直到 OD_{600} 达到 0.45。

(3) 在台式摇床上，将三角瓶置于冰上 30 min，使细胞迅速冷却，此后尽可能使细胞维持在 0℃。

(4) 将细胞培养物分装入 6 个 500 mL 离心管中（每管 333 mL）。

(5) 使用 Beckman R3C3 离心机，4℃，4000 *g* 离心 15 min。将每个离心管中的沉淀小心重悬于 167 mL 冰冷的蒸馏水中（共需 1 L 蒸馏水）并在摇床上轻轻摇动。不可过于用力或吹吸。重复此步骤 1 次。

(6) 将每个离心管中的沉淀小心重悬于 30 mL 冰冷的 10%甘油中，并将 6 管重悬液分装至 4 个 50 mL 离心管中。4000 *g* 离心 15 min。

(7) 将每个离心管中的沉淀小心重悬于 2 mL 冰冷的 10%甘油中并轻轻摇晃，将 4 管悬液合并在一个洁净的离心管中。轻轻旋转离心管使其混匀。

(8) 取 10 μL 悬液加入 3 mL LB 培养基 I 中（稀释 300 倍）并测量 OD_{600} 值。用冰冷的 10%甘油调整悬液的浓度至 OD_{600} 为 0.21。

(9) 将感受态细胞以每管 270 μL 分装入微量离心管中，直接干冰浴或乙醇浴冷冻。电感受态细胞能够在−80℃保存数月。

20.3.2 制备回收 pUR288 所需的 *lacI-lacZ* 融合蛋白

(1) 在 M9CA 选择性培养基（筛选脯氨酸缺陷型）上的甘油群落中划线（以分离不同的菌落）生产 *lacI/Z* 融合蛋白的品系。30℃培养过夜。

(2) 选择约 10 个菌落，在 M9CA 培养基（1.5 mL）中过夜培养。数小时后取样并划线涂于含有 X-gal（终浓度为 75 μg/mL）的 TY 板上（非选择性平板）。继续培养这些菌落，30℃将平板培养过夜。

(3) 选择在 TY X-gal 平板上显蓝色最深的培养物。

(4) 接种 0.5 mL 之前的培养物于 50 mL M9CA 培养基中。30℃培养过夜。

(5) 将 32 mL 预先培养过夜的培养物接种于 8 L TY 培养基（非选择性）中。

(6) 在 OD_{590} 为 1～2（对数期晚期）时收集细胞。取决于培养条件，这个浓度在 30℃摇晃培养约 6 h 后达到。

(7) 约 4000 *g* 的速度离心培养物 15 min，弃上清液。根据于离心步骤中离心管的数量和容量决定离心步骤的次数，使所有 8 L 的培养物全部沉淀。

(8) 称量沉淀质量：预期产量为 30～40 g。

(9) 重悬细胞：每克沉淀用 1 mL TS 缓冲液。

(10) 将细胞悬液直接滴入液氮中冷冻细胞，−20℃保存冷冻的液滴（与爆米花形似），以避免脱水。

(11) 将 75 mL 含有蛋白酶抑制剂的 TS 缓冲液（见 20.2.3 节）和 7.5 mL 裂解液混合，在加热板上预热至 37℃，使用架空搅拌（不要使用磁性搅拌器和转子）。

(12) 搅拌的同时向预热的混合液中快速加入冷冻的液滴（爆米花）。

(13) 调整 pH，必要时用稀释的 HCl 将 pH 调至 7.5。

(14) 加入 30 mg 溶菌酶（最大程度溶解在 50 mmol/L Tris，pH 7.5，10%蔗糖）。

(15) 将悬液置于冰上 1 h。

(16) 将悬液转移至 37℃水浴 4 min，再放回冰上。

(17) 将悬液分装至若干离心管中，4℃，23 000 *g* 离心 1 h。

(18) 取上清液并确定体积（110～140 mL）。置于冰上，同时缓慢加入（约持续

30 min，同时置于磁性搅拌器上轻轻搅拌）硫酸铵至40%饱和（每100 mL 24.3 g）。

（19）置于冰上（同时搅拌）1～2 h。

（20）分装于30 mL的离心管中，4℃ 18 000 *g* 离心15 min。

（21）−80℃保存沉淀。

（22）将一份冷冻的沉淀溶于1.5 mL DIANA缓冲液中。

（23）分成100 μL的等份，−20℃保存。

20.3.3　准备 *lacI-lacZ* 磁性微珠

（1）简短地漩涡震荡或摇晃包有羊抗鼠IgG的Dynal磁性微珠（4×10^8 个磁性微珠/mL），使微珠全部重悬。将1 mL微珠吸入微量离心管中，置于磁性台架（Dynal）上。

（2）除去澄清上清液，将微珠重悬于950 μL磷酸盐缓冲液（PBS）中，并加入50 μL抗-*β*-半乳糖苷酶单克隆抗体。涡旋振荡混合液，37℃，旋转孵育1 h。

（3）孵育后，在磁性台架上沉淀微珠，除去澄清上清液。

（4）用1 mL PBS洗沉淀3次，将沉淀重悬于995 μL PBS，并加入5 μL lacI-lacZ融合蛋白。37℃，旋转孵育混合液2 h。

（5）接着，用1 mL PBS洗沉淀3次。lacI-lacZ微珠能够在4℃下保存至少6个月。

20.3.4　收集小鼠组织

（1）依照当地法律和制度处死小鼠。我们的实验室中使用 CO_2 吸入法和颈脱位法。

（2）取待研究的组织，用PBS冲洗。

（3）立即将组织置于1.5 mL微量离心管中，在干冰或液氮上冷冻，−80℃保存样品。

20.3.5　收集果蝇

（1）果蝇饲养于塑料瓶中，可以通过瓶口的泡沫栓取出果蝇。瓶子保存在室温下。

（2）收集果蝇时，倒置瓶子，松开泡沫栓，使 CO_2 喷嘴进入瓶子。

（3）使 CO_2 缓慢进入瓶子，麻醉果蝇。

（4）将麻醉的果蝇置于有 CO_2 连续吹过的平板上。

（5）使用解剖显微镜和一支小水彩笔分离雄果蝇和雌果蝇。雌雄果蝇可以通过检查生殖器和着色情况辨别。雄果蝇的生殖器周围有浓重的刚毛，而雌果蝇没有。另外，雄果蝇腹部的后1/5为纯黑色，而雌果蝇带有条状图案直至腹部末端。

（6）区分性别，将果蝇分组，每50只置于1个2 mL微量离心管中。立即将离心管置于干冰上。

20.3.6　提取小鼠基因组DNA

（1）在50 mL离心管中放入冷冻的组织和9 mL裂解液，使用Brinkmann匀浆器使组织均匀。加入1 mL 10%十二烷基硫酸钠（SDS）（终浓度为1%），60 μL 20 mg/mL

RNase A（终浓度为 120 μg/mL），200 μL 25 μg/mL 蛋白酶 K（终浓度 0.5 mg/mL）。50℃在杂交箱中旋转消化组织过夜。

（2）第二天上午加入 1 体积苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1，在摇摆器上轻轻晃动 20 min。4000 *g* 离心样品 20 min。将水相转移至新的离心管中，不要转移水相/有机相界面的物质。重复此步骤 2～3 次直到得到澄清的水相（**注释 3**）。

（3）加入 1/5 体积的 8 mol/L 乙酸钾溶液（约 2 mL），轻轻与样品混合。加入 1 体积氯仿，在摇床上轻轻摇动 20 min。4000 *g* 离心样品 20 min。

（4）将水相转移到洁净的离心管中，不要转移水相/有机相界面的物质。加入 2 mL 无水乙醇，轻轻混合，沉降 DNA。用密封玻璃 Pasteur 移液器抽出 DNA，在含有 500 μL 70%乙醇的离心管内挥动，再将 DNA 放入另一个含有 250 μL 70%乙醇的离心管内。14 000 *g* 离心 5 min，除去所有微量的乙醇。风干数分钟。将 DNA 溶于 100～1000 μL TE 缓冲液中。

20.3.7　提取果蝇基因组 DNA

（1）在装有 50 只果蝇的 2 mL 微量离心管中加入现配的 600 μL 裂解液，用一次性研杵使其均质化。

（2）加入 12 μL 蛋白酶 K（25 mg/mL），60 μL 10% SDS，10 μL RNase A（20 μg/mL）。65℃旋转 30 min，轻轻混合。

（3）冷却至室温，加入 600 μL 苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1，室温旋转离心管 10 min。

（4）室温 10 000 *g* 离心样品 10 min。

（5）收集上清液，转移至含有 1/5 体积 8 mol/L 乙酸钾（120 μL）的洁净离心管内，倒置以混合样品。加入 1 体积氯仿，室温下在摇床上轻轻摇动 10 min。

（6）重复**步骤（4）**。

（7）转移澄清上清液（避免收集界面处）至 1.5 mL 微量离心管中，加入 2 体积无水乙醇，轻轻与样品混合，沉降 DNA，DNA 肉眼可见。

（8）室温 14 000 *g* 离心沉降的 DNA 10 min。

（9）用 200 μL 70%的乙醇洗涤沉淀，14 000 *g* 离心 5 min。

（10）除去全部乙醇，室温晾干。

（11）在 60 μL TE 缓冲液中重悬 DNA。

（12）取少量样品（1 μL）跑琼脂糖电泳，估算 DNA 产率和品质。

20.3.8　使用磁性微珠从小鼠或果蝇 DNA 中回收 *lacZ* 质粒（**注释 4**）

（1）取 10～50 μg 基因组 DNA 并补充 56 μL 超纯水。

（2）加入 15 μL 5×结合缓冲液，轻轻上下吹吸以混匀。就果蝇而言，预先制好的混合液含有 15 μL 5×结合缓冲液和从 50 只果蝇中提取出的 56 μL DNA。混合液可以 4℃保存。

（3）向小鼠或果蝇样品混合液中加入 4 μL *Hin*d Ⅲ（40 U），轻轻上下吹吸。

（4）在磁性台架上沉淀 60 μL lacI-lacZ 磁性微珠，弃上清液。在 DNA/结合缓冲液/*Hin*d Ⅲ混合液中重悬微珠，轻微涡旋振荡。37℃旋转孵育 1 h。

（5）为每个样品准备两个培养瓶，一个含有 2 mL LB 培养基Ⅱ，另一个含有 1 mL LB 培养基Ⅱ。为每个样品准备供电穿孔用的 1 mL LB 培养基Ⅱ，置于冰上。

（6）为每个样品准备混合液，混合液含有 75 μL IPTG 洗脱液、5 μL IPTG 缓冲储备液、20 μL NE 缓冲液 2＃、100 μL 超纯水。

（7）孵育后，在磁性台架上沉淀微珠并弃上清液。用 250 μL 1×结合缓冲液洗涤微珠 3 次（轻轻涡旋振荡），再加入**步骤（6）**准备的 200 μL 混合液。轻轻涡旋振荡，37℃旋转孵育 1 h。

（8）转移样品至 65℃，孵育 20 min。取出样品，冷却至室温。再加入 2 μL ATP 溶液（终浓度为 0.1 mmol/L）、1 μL 0.1×T4 DNA 连接酶（总量为 0.1 U）。丢弃未使用的 ATP。

（9）简单离心以除去盖子上的冷凝物，轻轻涡旋振荡重悬微珠。室温孵育 1 h。

（10）涡旋振荡以重悬微珠，并置于磁性台架上。转移上清液（200 μL）至含有 1.5 μL 糖原（30 μg）和 0.1 体积乙酸钠（22 μL）的洁净离心管内。涡旋振荡混合液，加入 2.5 体积 95％的乙醇（560 μL），上下颠倒混匀。

（11）－80℃孵育 20 min，20 000 *g* 离心 25 min。除去乙醇，用 250 μL 70％的乙醇（涡旋振荡）洗涤 1 次，20 000 *g* 离心 5 min。除去全部乙醇（使用尖端细小的移液枪除去最后的微量乙醇），晾干 DNA 沉淀 10～15 min。用 5 μL 超纯水重悬 DNA。此时可以加入电感受态细胞。

20.3.9　电穿孔、涂板以及突变计数

（1）在冰上融化电感受态细胞。融化后，直接向含有 5 μL 水/DNA 溶液的离心管内加入 60 μL 细胞悬液。置于冰上。

（2）在冰上转移细胞与 DNA 的混合液至预先冷却的电穿孔样品池中（BioRad，电极间距 0.1 cm）。1.8 kV，25 μF（Gene Pulser，BioRad），200Ω（Pulse Controller，BioRad）进行电穿孔。立即加入 1 mL 冰冷 LB 培养基Ⅱ。接着转移至预先准备好的含有 1 mL LB 培养基的 15 mL 培养瓶中。37℃，225 r/min 摇动孵育 30 min。

（3）向培养瓶里的 2 mL LB 培养基Ⅱ中加入 2 μL 转化细胞（1∶1000）。与 13 mL LB 顶层琼脂混合，并小心倒入 10 cm 培养皿中。这就是滴定平板。

（4）向剩余的转化细胞中加入 13 mL LB 顶层琼脂。除了加入氨苄西林、卡那霉素以及氯化四唑之外，加入 p-gal 至终浓度为 0.3％（在将顶层琼脂加入转化细胞之前直接向顶层琼脂中加入粉末状的 p-gal）。可以加入 X-gal，但不是必须。使用 10 cm 培养皿。这是选择平板。

（5）37℃使细胞在滴定平板和选择平板上过夜，时间精确控制在 15 h。这之后立即进行菌落计数。滴定平板上的菌落数指示回收效率。典型产率约为每微克基因组 DNA50000 菌落（质粒拷贝数）。突变计数可以在测光台上完成。

（6）如果选择平板要用来表征突变，需要在菌落计数后立即将平板用保鲜膜包好，

4℃保存。

20.3.10　数据收集

（1）突变频率由 p-gal 选择平板上的菌落数（肉眼可见的深红色斑点）与 X-gal（非选择性）滴定平板上菌落数（带有较大蓝色晕圈的深红色斑点）的比率乘以转化细胞的稀释因子（通常为 1000）确定。

（2）每个突变频率确定点都基于同一样本至少 3 次的重复实验，每次实验至少回收 100 000 个菌落，因此每个样品回收的质粒总数至少为 300 000。

（3）将突变频率导入 Excel® 表格中，计算均值和标准偏差。

20.3.11　统计分析

统计分析视应用而定。以下是一些例子。

（1）*t* 检验用来检验两个独立样本正态分布平均值差别的显著性。若 *p* 值<0.05则被认为是显著的。Busuttil 等（***12***）使用这个统计方法将增殖细胞和静止细胞的平均突变频率相比较。

（2）在有 3 个或 3 个以上年龄组时，建议使用 Kruskal-Wallis 秩和检验对供体年龄的影响进行统计分析。如果这一检验表明年龄有重要的影响，则需要进行若干个 Wilcoxon 秩和检验，每次比较两组。这些非参数类的单因素方差分析（ANOVA）的类似方法以及 *t* 检验不需要关于数据分布的假设。

20.3.12　确定背景突变

尽管看起来大部分回收的 *lacZ* 突变都源于小鼠，但一部分突变很可能代表人为的假象，发生的频率约为 1.3×10^{-5}，与总的突变频率无关（***13***）。这一假象的最大一部分来自于 *Hin*d Ⅲ限制酶在回收步骤中消化基因组 DNA 时的“星”活性，突变频率约为 1.1×10^{-5}。这种“星”活性导致低频率的错误删除突变。所有的“星”位点都已知，因此这种假阳性在对突变的限制性分析时可以被识别（见下文）。余下的背景突变很可能由于 *galK* 和 *galT* 基因中的自发突变，产生半乳糖不敏感的大肠杆菌宿主细胞。这些突变发生在准备感受态细胞时，因此每一次半乳糖不敏感细胞出现的频率会不同。*Hin*d Ⅲ“星”突变和半乳糖不敏感细胞对样品突变频率的贡献能够通过一般的表征步骤确定（见下文）。尽管如此，使用从未成为小鼠基因一部分的“模拟回收”质粒来评估 *lacZ* 质粒系统的背景突变频率也很重要。步骤如下：

（1）通过获得用于常规突变频率确定的滴定平板上的深蓝染色菌落分离带有野生型 pUR288 质粒的大肠杆菌细胞。

（2）37℃，225 r/min 在含有氨苄西林（终浓度为 75 μg/mL）和卡那霉素（终浓度为 25 μg/mL）的 3 mL LB 培养基上摇动培养细胞 8 h。

（3）1000 *g* 离心 10 min 收集细胞。

（4）吸出上清液，将沉淀重悬于 600 μL 裂解液中。如**副标题 20.3.7** 提取 DNA，从**步骤（2）**开始。

（5）以 1∶10 和 1∶100 的比例用水稀释 DNA。

（6）取 1 μL 稀释的 DNA 与 10～40 mL 来自非转基因小鼠或果蝇的纯化的基因组 DNA 混合。

（7）按照 20.3.8 节所述的 *lacZ* 质粒回收步骤确定突变频率，应该在 1×10^{-5} 数量级上。

20.3.13　突变特性表征（**注释 5**）

可以方便地将突变划分为无变化突变体（变化少于 50 bp）和尺寸变化突变体（基因内的大小变化或基因重组）。

（1）从 p-gal 平板上挑出突变菌落，分别转移至每孔含有 150 μL LB 培养基Ⅰ、25 μg/mL卡那霉素、150 μg/mL 氨苄西林的圆底 96 孔板中。封起 96 孔板，37℃，200 r/min 过夜摇晃培养（Innova 4000 摇晃培养箱；New Brunswick Scientific）。

（2）第二天上午检查过夜培养物的生长状况。记录未生长的培养物（**注释 6**）。

（3）对每个突变体，向 96 孔 PCR 板的各孔中加入含有 11.5 μL 超纯水，0.5 μL 12.5 μmol/L pUR 4923-R 引物（**表 20.1**），0.5 μL 12.5 μmol/L pUR 3829-R 引物（**表 20.1**），12.5 μL Qiagen HotStar Taq Master 混合物的 25 μL 混合液。

（4）取每个突变体培养物的一个样本转移至含有 PCR 混合物的 96 孔板中，使用 Boekel 复制器。95℃ 10 min，接着进行 95℃ 20 s、68℃ 8 min 的周期，然后最后延长一个 68℃ 的周期至 10 min，完成扩增。

（5）使用 Boekel 复制器将每个培养物的一个样本转移至 X-gal 平板（确保培养物重悬）进行半乳糖敏感性筛选。标记最下面平板的右侧，37℃倒置培养。

（6）向每个培养基中加入 50 μL 50%甘油并混合。封装平板，−80℃存放甘油储备液。

（7）对培养物蓝染色 1～3 h 后检查 X-gal 平板。这些是含有野生型质粒（假突变体）的半乳糖不敏感型宿主细胞。记录被染成蓝色的培养物。

（8）继续 37℃过夜培养 X-gal 平板以筛选突变体。无色菌落代表基因重组或者完全抑制 β-半乳糖苷酶活性的内部 *lacZ* 突变。淡蓝色菌落通常是部分抑制 *lacZ* 基因的点突变，因此 β-半乳糖苷酶尚有部分活性（***14***）。

（9）在新的 96 孔 PCR 板中使用溶于 NEB♯4 的 5 U *Ava* Ⅰ（总体积为 15 μL）消化 PCR 产物。15 μL 混合液包括 5 μL PCR 产物、8 μL 水、1.5 μL 10×NEB♯4，0.5 μL *Ava* Ⅰ（10 U/μL），37℃孵育 1 h。使用 HotplateSealer 封装 PCR 样品，−20℃保存。

（10）加入 2 μL 10×上样缓冲液，在 1%琼脂，1×TBE 胶上将已消化的样品与 1 kb DNA 梯（GIBCO，每通道 1 μg）进行电泳。可以方便地将突变划分为无变化突变体（变化少于 50bp）和尺寸变化突变体（基因内的大小变化或基因重组）。校正半乳糖不敏感型回复突变体后，分类并确定无变化突变体和尺寸变化突变体的百分数。无变化突变体的分类基于 1%琼脂糖凝胶（**图 20.2B**）上 *Ava* Ⅰ 的野生型限制模式（1992+1443+818 bp；**图 20.2A**）。任何对此模式的偏离即为尺寸变化突变体（**图 20.2B**）。

（11）为了检查可能的克隆造成的突变假象，每只小鼠的序列突变按惯例使用 *Hind*

Ⅲ再次消化。基因组中随机的 *Hin*d Ⅲ碎片时常被克隆至质粒的 *Hin*d Ⅲ位点。克隆的片段并不改变细菌宿主的表现型，但可以使点突变在用上述 *Ava* Ⅰ表征方法时看起来像尺寸变化突变。PCR 扩增的 *lacZ* 基因在 *Hin*d Ⅲ消化后，若碎片数超过 2 个，则认为是克隆假象（**表 20.2**）。

表 20.1 检测中使用的引物

引物 ID	引物序列	使用（节号）
pUR4923-F	5′ TGG AGC GAA CGA CCT ACA CCG AAC TGA GAT 3′	20.3.13
pUR 3829-R	5′ ATA GTG TAT GCG GCG ACC GAG TTG CTC TTG 3′	20.3.13
pUR3285-F	5′ GGA TCC GTC GAC TCT AGA A 3′	20.3.14
pUR3421-R	5′ GCC ACC TGA CGT CTA AGA A 3′	20.3.14
pUR4071-F	5′ GTG ACA CCA CGA TGC CTG CA 3′	20.3.14
pUR4181-R	5′ TAT CCG CCT CCA TCC AGT CT 3′	20.3.14
pUR0366-F	5′ CAG TTG CGC AGC CTG AAT GG 3′	20.3.15
pUR0794-F	5′ TGA CGG CAG TTA TCT GGA AG 3′	20.3.15
pUR1234-F	5′ ATG GTC TGC TGC TGC TGA AC 3′	20.3.15
pUR1671-F	5′ CAG TAT GAA GGC GGC GGA GC 3′	20.3.15
pUR2113-F	5′ CCG GGC AAA CCA TCG AAG TG 3′	20.3.15
pUR2552-F	5′ GCC GCT GCG CGA TCA GTT CA 3′	20.3.15
pUR5268-F	5′ CCG CCT TTG AGT GAG CTG AT 3′	20.3.15
pUR3367-R	5′ GCG TAT CAC GAG GCC CTT TC 3′	20.3.15

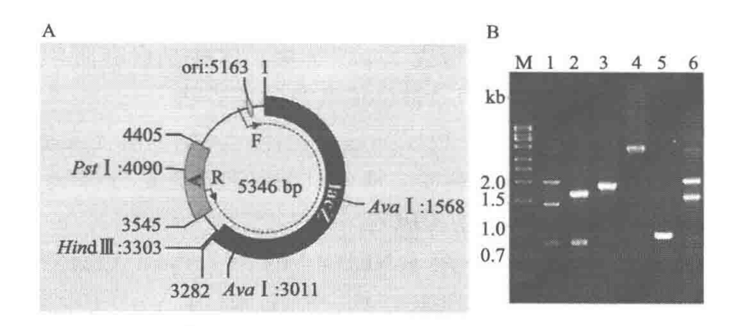


图 20.2 （A）带有 *lacZ* 基因（1～3282）和 *Ava* Ⅰ位点的 pUR288 质粒图谱。图示复制起始点，即带有 *Pst* Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ位点的氨苄西林抗性基因；（B）对筛选平板上的突变菌落在 PCR 扩增和 *Ava* Ⅰ酶切后进行凝胶电泳。溴化乙锭染色后，无变化的突变显示出野生型条带（2.0＋1.4＋0.82；条带 1）。偏离这一模式的显示出尺寸突变（条带 2～6）。标记：1 kb 梯（Fisher BioReagents）

表 20.2　*Ava* Ⅰ，*Hind* Ⅲ，*Msp* Ⅰ 酶切后野生型 *lacZ* 质粒和 *Hind* Ⅲ “星” 突变的限制酶模式

位点*	*Ava* Ⅰ对质粒 DNA 的酶切模式	PCR 扩增后 *Ava* Ⅰ酶切	*Hind* Ⅲ对 PCR 产物的酶切	*Msp* Ⅰ对 PCR 产物的酶切
野生型	2.8+1.4+1.0	2.0+1.4+0.82	3.8+0.5	NA
2879	2.8+2.0	2.0+1.8	3.8	NA
2468	2.8+1.6	2.0+1.4	3.4	NA
2168	2.8+1.3	2.0+1.1	3.1	NA
613	2.6	1.6	1.0+0.5	0.6+0.5+0.35
433	2.4	1.4	0.8+0.5	0.5+0.5+0.35
322	2.3	1.3	1.3	NA
213	2.2	1.2	1.2	NA
118	2.1	1.1	1.1	NA
54	2.0	1.0	1.0	NA
5282	1.9	0.9	0.9	NA

* “星”突变中观察到的 *Hind* Ⅲ限制性位点核苷酸位置。

NA，不适用（not applicable）。

20.3.14　使用 PCR 迅速确认基因重组型突变

此 PCR 检验可以用来将尺寸变化突变体分为内部突变（如完全在 *lacZ* 基因内部发生的突变）或涉及小鼠基因组的突变。这一检验不能给出突变的确切断点（这需要通过测序来实现）。此 PCR 扩增使用 *Hind* Ⅲ 位点前面的 lacZ 末尾 18 bp 的上游引物（pUR3285-F；**表 20.1**），同时结合 *Hind* Ⅲ 位点之后的下游引物（pUR3421-R；**表 20.1**）。这一引物组合只有在 *lacZ* 基因 3′端还存在时才能引起 137 bp 的片段的生成。因此，产物的缺失表明大型重组导致了 3′端缺失。作为 PCR 的阳性对照，构造氨苄西林抗性基因特异性的引物组（pUR4071-F 和 pUR4181-R；**表 20.1**），在同一反应中同时扩增一个 111bp 的片段。导致 111 bp 片段的扩增和 137 bp 片段的缺失的突变体质粒模板，被认为带有重组突变造成的被截去 *lacZ* 基因的末端，并在小鼠/果蝇基因组中有一个断点。注意，在这一检验中，之前提到的“星”突变会表现为基因重组。这些步骤始终应用于 mini-prepped 突变体上，而不是 PCR 扩增的质粒序列。我们的经验表明，mini-prepped 突变体为后续的测序提供更好的模板。如果使用 PCR，需要设计新引物。

（1）按照低复制质粒（QIAprep Spin Miniprep kit/Qiagen）的说明制备 Miniprep 突变。

（2）制备 PCR 混合物，含有 12.5 μL Qiagen Hotstart mix，每种初始浓度为 12.5 μmol/L的引物各 1 μL，8 μL 水。

（3）加入 0.5 μL 模板 DNA。按如下步骤扩增：95℃，12 min；然后进行 30 个循环（95℃，40 s；50℃，40 s；72℃，40 s），以及最终延长，72℃，10 min。

（4）向每种 PCR 产物中加入 2 μL 10×上样缓冲液，将全部样品上在 2%琼脂糖，1×TBE 凝胶上。

20.3.15　突变测序

要确定 *lacZ* 突变的性质或重排的断点，有必要进行测序。如上所述，最好使用 mini-prepped 质粒。

（1）选择感兴趣的突变株，接种在含有 25 μg/mL 卡那霉素和 150 μg/mL 氨苄西林的 6 mL LB 培养基Ⅰ中。由于 pUR-228 是一个低拷贝质粒，每个样品需要 3 个微量制备培养管，以达到测序整个 *lacZ* 基因所要求的质粒 DNA 的量。

（2）37℃，225 r/min 过夜培养样品。

（3）第二天上午，室温 272 *g* 离心样品。

（4）从培养管中小心吸出 LB 培养基，注意不要搅动细胞沉淀。

（5）按照制造商给出的步骤微量制备低拷贝质粒（QIAprep Spin Miniprep kit/Qiagen）。

（6）在 50 μL 超纯水中洗脱样品，合并 3 个培养管中的样品。

（7）使用 Montage PCR 离心过滤设备（Millipore）纯化样品，并将浓缩的质粒 DNA 重悬于 45 μL 超纯水中。

表 20.1 列出了为涵盖从碱基 1～3096 的整个 *lacZ* 基因而设计的引物（**图 20.2A**），参照 Genbank 中可得到的 pUR288 质粒序列（称为 SYNPUR288V）。为了确定点突变的性质和位置，有必要对整个 *lacZ* 基因进行测序，在这种情况下需要使用全部引物。对序列长度变化突变测序的引物根据具体情况，由突变株的 *Ava* Ⅰ限制模式选择（全部突变株不需要使用全部引物）。通过比较测出的突变株序列与 pUR288 共有序列来识别突变。使用小鼠或果蝇序列数据库，以作为 *lacZ* 突变质粒一部分而获得的小鼠或果蝇的小片段为基础，可以确定其基因组中 3′端断点（**图 20.1**）。**表 3** 列出了以这种方式表示出的基因重组的例子。

表 20.3　果蝇或小鼠基因组重组的例子

突变 ID	来源[a]	断点序列（5′→3′）[b]		来源[c]
果蝇 42	远端	GGTGCCGGAAAGTTGGCTGG *gtaatatataccctttactg*	agtgcgatcttcctgaggcc *TGTGCTAATTACTAATGCTT*	pUR288 Chr. 2L
果蝇 43	近端	CTGGTACAACCCTGGCGTTA *taagtggcagccacaaaaga*	cccaacttaatcgccttgca *AGCAAAAAAAAAAAGTGGAA*	pUR288 Chr. 3R
果蝇 44	远端	GCGGATAACAATTTCACACA *aaaaataaaatgatttgcaa*	ggaaacagcaatgaccatga *AAAAATAAAATGATTTGCAA*	pUR288 Chr. 2L
果蝇 46	远端	GGTGCCGGAAAGTTGGCTGG *aatttatttaaagccgctgc*	cgcctgggtcgaacgctgga *CCAAATCCCGCCGTCTATTT*	pUR288 Chr. 3R
小鼠 26	近端	GGCGTTAACCGTCACGAGCA *gatggatgtaatagctgtga*	tggtctgctgctgctgaacg *TCTTATCAAATGGTGCATTT*	pUR288 Chr. 13
小鼠 65	近端	ATTAATGTGAGTTAGCTCAC *accccaccccactgcacccc*	caggtttcccgactggaaag *AGGAAGGGGCTTCTAAAGCC*	pUR288 Chr. 11
小鼠 66	远端	CGTTTCATCTGTGGTGCAAC *tcctttggagcacatgatga*	gaaggccagacgcgaattat *ATAAGCTAAACACACAACTG*	pUR288 Chr. 14
小鼠 85	远端	GCGATCGTAATCACCCGAGT *tctattctaaagaaggcgga*	ctaccggcgatgagcgaacg *GTGAAAGTCGTGCATGCTTA*	pUR288 Chr. 15

a. 回收基因组片段的远端（端粒方向）或近端（着丝粒方向）定位方向。

b. 果蝇/小鼠序列下斜体的是 *LacZ* 序列。小写字母为删除的 *lacZ* 或小鼠/果蝇序列，大写字母是保留的序列。粗体字表示 pUR288 的断点以及在果蝇或小鼠基因组中继续的位置。此分析中使用的核苷酸序列为 SYNPUR288V（GenBank，L09147）。进一步信息请参阅 Dollé et al 的论文（*9*）。

c. **L**，果蝇基因组的左臂；**R**，右臂。

品系 60 和品系 30 的 *lacZ* 的转基因小鼠都带有已知多态性位点（**表 20.4**）（***13***），在将突变株与野生型 *lacZ* 序列比较时，不应将其与突变混淆。多态性位点总是伴随着一个独特的突变。我们实验室开发的转基因果蝇品系不包含任何已知多态位点。

表 20.4　与 GenBank 中 pUR288 共有序列比较的 LacZ 多态性位点

品系 ID	碱基位置	序列	碱基对变化
品系 60	81	ACTGGA **A** AGCGGG	A>T
	85	GAAAGC **G** GGCAGT	G>A
	507	TACGAT **G** CGCCCA	G>A
	761	CGGAGA **A** AACCGC	A>G
	1214	CGGTTT **C** CGCGAG	C>T
	1230	CGGATT **G** AAAATG	G>A
	1371	AACTTT **A** ACGCCG	A>G
	1673	GGTGCA **G** TATGAA	G>C
	1996	ATTTTG **G** CGATAC	G>T
	2166	GATAAC **G** AGCTCC	G>A
	2389	TGGCGG **A** AAACCT	A>G
	2927	GCCGCA **A** GAAAAC	A>G
	2980	ATCTGC **C** ATTGTC	C>T
	3020	GAGCGA **A** AACGGT	A>G
品系 30	106	CGCAAT **T** AATGTG	T>C
	227	CATGAT **T** ACGGAT	T>A
	1980	TCGGCT **T** ACGGCG	T>A

资料来源：Dollé 等（***13***）给出了品系 60 的位点；**参考文献 *15*** 列出了品系 30 的位点。

对于品系 60 小鼠，使用荧光原位杂交（FISH）和遗传图谱确定 3 号和 4 号染色体上质粒串联体与着丝粒的距离分别为 59.5 Mb 和 87.2 Mb（***9***）（**表 20.5**）。对于品系 30 小鼠，使用 FISH 技术确定了 *lacZ* 基因位于 11 号染色体的 A1～A2 区域。然而，由于整合位点未被克隆，目前无法对这个小鼠品系确切定位 *lacZ*-质粒群。对于转基因果蝇来说，共产生 12 个不同的品系，但只定位出了整合位点在染色体 3R 上的品系 11B 的整合位点，而且表征了紧邻 5′序列的转基因构造（**表 20.5**；Garcia et al.，已投稿）。这种情况下，发现 pCasper 载体距着丝粒 913 kb（Garcia et al.，已投稿）。

表 20.5　果蝇和小鼠中 lacZ 转基因的整合位点

品系	序列（5′→3′）[a]	染色体	来源[b]
果蝇 11B	ACCTTCCTTATTTATTACAA	3R	近端
品系 60 整合位点 A[a]	CTTTGTACTGCTCTTTCTTG	3E 1	远端
品系 60 整合位点 B[a]	TCTAATAGAAATATTTTCAA	4 C5	近端
品系 30	未确定	11 A1-A2	未确定

a. 小鼠或果蝇序列紧邻整合位点的 5′端。

b. 回收基因组片段的远端（端粒方向）或近端（着丝粒方向）定位方向。

20.4 注释

(1) 很重要的一点是确保所有试剂清洁，并且不含有携带β-内酰胺酶的质粒（测试的目的就是选出 *lacZ* 基因缺陷的氨苄西林抗药性质粒）。

(2) 制备 lacI-lacZ 融合蛋白。

(a) 使用基本培养基保存带有 lacI-lacZ 融合蛋白的质粒。质粒通过菌株中的脯氨酸营养缺陷型的互补效应而保存。

(b) 由于硫酸铵溶解较慢，若加过快，有局部浓度过高的危险，会造成融合蛋白的沉降。

(3) 小鼠基因组 DNA 的提取。

(a) 一些组织（小肠、脾、肾）倾向于形成黏性水相。这种情况下，需要额外使用苯酚和氯仿提取。

(b) 建议从非转基因组织中提取基因，与常规样品一起做平行实验，作为对照以避免污染。

(c) 并不总是需要从整个器官中提取 DNA。例如，1/3 的肝脏、1 个肾、小肠的一小块，都分别能够得到多次试验所需的足够 DNA。

(4) 使用磁性微珠从小鼠或果蝇基因组 DNA 中回收 lacZ 质粒。

(a) 对于黏性的 DNA，用 1×结合缓冲液增加等量 DNA 的反应体积。

(b) 也可以用 *Pst* Ⅰ限制酶回收小鼠和果蝇样品中单个的 *lacZ* 报告质粒。与 *Hin*d Ⅲ相反，*Pst* Ⅰ对基因组 DNA 的酶切能够排除一个断点在报告基因上而另一个断点在基因组其他位置的基因重组，因此，只有基因内事件，如删除、插入和点突变能够被回收。由于 *Pst* Ⅰ的限制性位点位于β-内酰胺酶基因上，因此，使用不完全氨苄西林抗性基因剪切重组导致的突变质粒（**图 20.1**）（***14***）。这就解释了为什么用 *Hin*d Ⅲ酶切的 *lacZ* 质粒相比 *Pst* Ⅰ酶切的质粒有较高的突变频率。

(c) 最近，我们将 *Hin*d Ⅲ的供应商从 New England Biolabs 换成了 Roche。尽管 NEB 酶的较早批次在这一突变测试中表现较好，但我们和其他人得到的最近一批却导致了额外带有非 pUR288 衍生质粒的背景菌落。更换供应商解决了这一问题。由于两个供应商产品之间的浓度相差 2 倍，我们参照之前发表的文章相应地调整了 *Hin*d Ⅲ的使用量。

(d) 在回收步骤中应始终加入几个额外的样品作为对照组：①非转基因对照（**注释 3b**），作为对 DNA 提取步骤时发生污染的对照；②应包含水的对照，以确认回收步骤中的污染是由于实验错误还是溶剂污染；③在 X-gal 平板上培养一个突变频率和效率都已知的样品，作为每个测试中发现的新回收值的参照。

(5) 突变体特性表征。对于小鼠，现在有必要对所谓的 *Hin*d Ⅲ“星”突变进行修正。用来产生小鼠模型的原始 *lacZ* 质粒含有若干此类位点，低频率的成为酶切的对象，错误地显示出大小变化的突变。这些假阳性突变体通常占到总大小突变数的比例不到 20%（***13***）。表 2 列出了“星”位点及其典型的限制模式。值得注意的是，由于产生模

型时已从构建的 *lacZ* 质粒中除去，果蝇模型不含有此类位点。

（6）在对菌落计数之前孵育过夜。重要的是保证转化细胞的过夜孵育时间一致，以比较不同天数时的结果。特别地，选择平板含有高浓度的非转化细胞。依我们的经验，氨苄西林无法有效杀死这些非转化细胞。氨苄西林充分降解之后，一些非转化大肠杆菌细胞开始在突变菌落周围形成所谓的“卫星菌落”。由于这是一个渐进的过程，不同实验中的不同孵育时间导致不同的突变频率。然而，在大型实验中进行菌落计数可能需要大量时间，而且有时会与当天计划的其他实验冲突。由于这个问题对选择平板而言最为紧迫，因此如前面所述，我们建议先对选择平板计数。如果另一个实验需要优先注意，可以将平板 4℃保存数小时以延迟计数。

参 考 文 献

1. Vijg, J. (2000) Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat. Res.* **447**, 117-135.
2. Vijg, J. and Dollé, M. E. (2002) Large genome rearrangements as a primary cause of aging. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 907-915.
3. Fukuchi, K., Martin, G. M., and Monnat, R. J., Jr. (1989) Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5893-5897.
4. Gossen, J. A., de Leeuw, W. J., Tan, C. H., et al. (1989) Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7971-7975.
5. Boerrigter, M. E., Dolle, M. E., Martus, H. J., Gossen, J. A., and Vijg, J. (1995) Plasmid-based transgenic mouse model for studying in vivo mutations. *Nature* **377**, 657-659.
6. Szilard, L. (1959) On the nature of the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **USA** 45, 30-45.
7. Dollé, M. E., Giese, H., Hopkins, C. L., Martus, H. J., Hausdorff, J. M., and Vijg, J. (1997) Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice. *Nat. Genet.* **17**, 431-434.
8. Dollé, M. E., Snyder, W. K., Gossen, J. A., Lohman, P. H., and Vijg, J. (2000) Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8403-8408.
9. Dollé, M. E. and Vijg, J. (2002) Genome dynamics in aging mice. *Genome Res.* **12**, 1732-1738.
10. Dollé, M. E., Martus, H. J., Gossen, J. A., Boerrigter, M. E., and Vijg, J. (1996) Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis* **11**, 111-118.
11. Gossen, J. A., Martus, H. J., Wei, J. Y., and Vijg, J. (1995) Spontaneous and X-ray-induced deletion mutations in a LacZ plasmid-based transgenic mouse model. *Mutat. Res.* **331**, 89-97.
12. Busuttil, R. A., Rubio, M., Dollé, M. E., Campisi, J., and Vijg, J. (2006) Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lac-plasmid reporter mice. *DNA Repair* **5** (**1**), 52-60.
13. Dollé, M. E., Snyder, W. K., van Orsouw, N. J., and Vijg, J. (1999) Background mutations and polymorphisms in lacZ-plasmid transgenic mice. *Environ. Mol. Mutagen* **34**, 112-120.
14. Dolle, M. E., Martus, H. J., Novak, M., van Orsouw, N. J., and Vijg, J. (1999) Characterization of color mutants in lacZ plasmid-based transgenic mice, as detected by positive selection. *Mutagenesis* **14**, 287-293.
15. Dollé, M. E., Busuttil, R. A., Garcia, A. M., et al. (2006) Increased genomic instability is not a prerequisite for shortened lifespan in DNA repair deficient mice. *Mutat. Res.* **596**, 22-35.

第21章 细胞衰老研究中的消减杂交技术

Subtractive Hybridization Techniques to Study Cellular Senescence

Michal Bassani Sternberg，Shimon Gepstein

摘要 与衰老症状相关的分子和细胞过程由基因差异表达的程序决定。消减杂交cDNA是一个能够在多种体系中确定并分离差异表达基因的强大方法。一个非常有效的方法称为抑制性消减杂交（SSH）技术，已用于产生衰老叶片的消减cDNA文库。该方法包括两个主要步骤：①归一化，在目标群体中消减使cDNA的丰度相等；②消减步骤，消除目标群体和驱动群体之间的共同序列。在衰老植物细胞中，已成功产生了含有大量丰富且稀有的cDNA克隆文库，证明了这一方法可以广泛用于确定细胞衰老过程中差异表达的基因。

关键词 基因表达；叶片衰老；程序性衰老；抑制性消减杂交

21.1 引言

细胞、组织或整个机体的衰老一般由与生命周期终点事件相关联的进程组成。有两个主要理论解释衰老现象。第一种理论是“程序性衰老”，认为衰老是遗传程序的结果，一种“生物学时钟”决定了导致细胞、器官或整个机体死亡的生化事件的发生。第二种理论认为衰老是一个“磨损”现象，由称为自由基的不稳定分子产生的随机错误积累造成。

大多数单次结实性（一年生）植物表现出“程序性衰老”，而人类衰老被认为主要由自由基损伤调控。不论老化和衰老过程是“磨损”类型的损伤积累的过程，还是像发育过程一样有序的程序性过程，都可以通过比较每个系统中全局基因表达来确认和研究分子和细胞事件。

近年来，我们把重点放在与叶片程序性衰老相关的分子事件的研究上。

叶片衰老是一年生植物生命周期中的一个关键的发育步骤。叶片在生长中积累的有机物质在叶片衰老阶段被重新固定在发育的果实和种子中。尽管在叶片衰老方面有大量的生理生化数据，参与这一进程的分子活动和机制尚不明了。有证据表明，与其他受调控的发育过程类似，叶片衰老也是由一系列特定基因的表达所调控。因此，对衰老过程中基因差异表达的全面研究很可能将揭示调控此现象的分子事件。

若干旨在确定衰老过程中表达增强的基因的技术已经发表。其中包括：示差筛选（***1～4***），消减杂交（***5***），差异显示技术（***6～9***），cDNA - AFLP技术（***10***，***11***）和抑制性消减杂交（***12***，***13***）。

cDNA微阵列和Affymetrix基因芯片的应用大大提高了在模式生物，如拟南芥中，确定差异表达基因的速度。然而，其他物种的微阵列的缺乏或成本的限制使得抑制性(SSH)成为首选方法。

若干种消减杂交技术已用于确定老化和衰老中的基因产物，本章将详细介绍一种最新、最有效的消减杂交方案(***14***)。

SSH功能强大，使研究人员能够比较两个群体的mRNA，并确定差异表达的基因。用这两个群体的mRNA制备cDNA，一个群体的cDNA被指定为"测试者"，是含有特定(优先表达)副本的cDNA群体，另一个是"驱动群体"，即cDNA群体的参考。对测试和驱动cDNA进行杂交，除去生成的杂交序列，余下的未杂交的cDNA克隆则代表了测试群体中优先表达的基因。SSH方法与其他消减方法相比的主要优势在于对不丰富的差异表达基因的选择性扩增以及对丰富基因的抑制。因此，稀有的基因与丰富的基因同样都能够表现出来。

21.2　材料

以下成分包含在PCR-选择cDNA消减试剂盒中(Clonetech)。

21.2.1　第一链合成

(1) AMV逆转录酶(20 U/μL)。

(2) cDNA合成引物(10 μmol/L)，5′TTTTGTACAAGCTT$_{30}$ N$_1$N 3′。

(3) 5×第一链缓冲液：250 mmol/L Tris-HCl pH 8.5，40 mmol/L $MgCl_2$，150 mmol/L KCl，5 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)。

21.2.2　第二链合成

(1) 20×第二链酶混合物：DNA聚合酶Ⅰ，6 U/μL；RNase H 0.25 U/μL；大肠杆菌DNA连接酶1.2 U/μL。

(2) 5×第二链缓冲液：500 mmol/L KCl，50 mmol/L硫酸铵，25 mmol/L $MgCl_2$, 0.75 mmol/L β-NAD，100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5，0.25 mg/mL牛血清白蛋白(BSA)。

(3) T4 DNA聚合酶(3 U/μL)。

21.2.3　核酸内切酶消化

(1) 10×*Rsa* Ⅰ限制缓冲液：100 mmol/L双三羟基甲氨基丙烷-HCl pH 7.0；100 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/LDTT。

(2) *Rsa* Ⅰ (10 U/μL)。

21.2.4　衔接子连接

(1) T4 DNA连接酶(400 U/μL；含3 mmol/L ATP)。

(2) 5×连接缓冲液：250 mmol/L Tris-HCl pH 7.8，50 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，0.25 mg/mL BSA。

(3) 衔接子 1（10 μmol/L）：5′CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCG-GCCGCCCGGGCAGGT3′3′GGCCCGTCCA 5′。

(4) 衔接子 2R（10 μmol/L）：5′CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTG-GTCGCGGCCGAGGT3′3′GCCGGCTCCA 5′。

21.2.5 杂交

(1) 4×杂交缓冲液。

(2) 稀释缓冲液：20 mmol/L HEPES-HCl pH 8.3，50 mmol/L NaCl，0.2 mmol/L EDTA pH 8.0。

21.2.6 PCR 扩增

(1) PCR 引物 1（10 μmol/L）：5′CTAATACGACTCACTATAGGGC 3′。

(2) 嵌套 PCR 引物 1（10 μmol/L）：5′TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT 3′。

(3) 嵌套 PCR 引物 2（10 μmol/L）：5′AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT 3′。

(4) PCR 对照消减 cDNA。

21.2.7 通用试剂

(1) dNTP 混合液（dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 10 mmol/L）。

(2) 20×EDTA/糖原混合物（0.2 mol/L EDTA，1 mg/mL 糖原）。

(3) 4 mol/L NH_4OAc。

(4) 无菌 H_2O。

21.2.8 额外需要的试剂

(1) 80%和 96%的乙醇。

(2) 苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1。按以下步骤配制：

(a) 融化苯酚。

(b) 用相同体积的无菌 TNE 缓冲液平衡（50 mmol/L Tris pH 7.5，150 mmol /L NaCl，1 mmol/L EDTA）。

(c) 室温孵育混合物 2～3h。

(d) 弃上层。

(e) 向余下溶液层中加入等体积的氯仿-异戊醇混合液，体积比为 24∶1。完全混合，弃上层。

(f) 避光 4℃ 保存底层的苯酚∶氯仿∶异戊醇混合液，最多保存 2 周。

(3) 氯仿-异戊醇混合液，体积比为 24∶1。

(4) 10×PCR 缓冲液。

(5) PCR 用 dNTP 混合物。

（6）50×TAE 电泳缓冲液：242 g Tris 碱，57.1 mL 冰醋酸，37.2 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$。

21.3　方法

图 21.1 详细介绍了在 PCR-选择 cDNA 消减时发生的分子事件。首先，从两种组织或细胞（即包含特定的优先表达的 cDNA 群体的测试组和作为参照 cDNA 群体的驱动组）中提取 0.5～2 μg poly（A）$^+$ RNA 合成 cDNA。接着用产生平整末端的限制酶 *Rsa* Ⅰ酶切测试和驱动 cDNA。将测试 cDNA 分成两部分，每部分与不同的 cDNA 衔接子连接。衔接子的末端没有磷酸基团，因此每个衔接子只有一个链与 cDNA 的 5′端相连。这两个衔接子的延伸序列相同，使得 PCR 引物在凹缺末端被填平之后就退火。

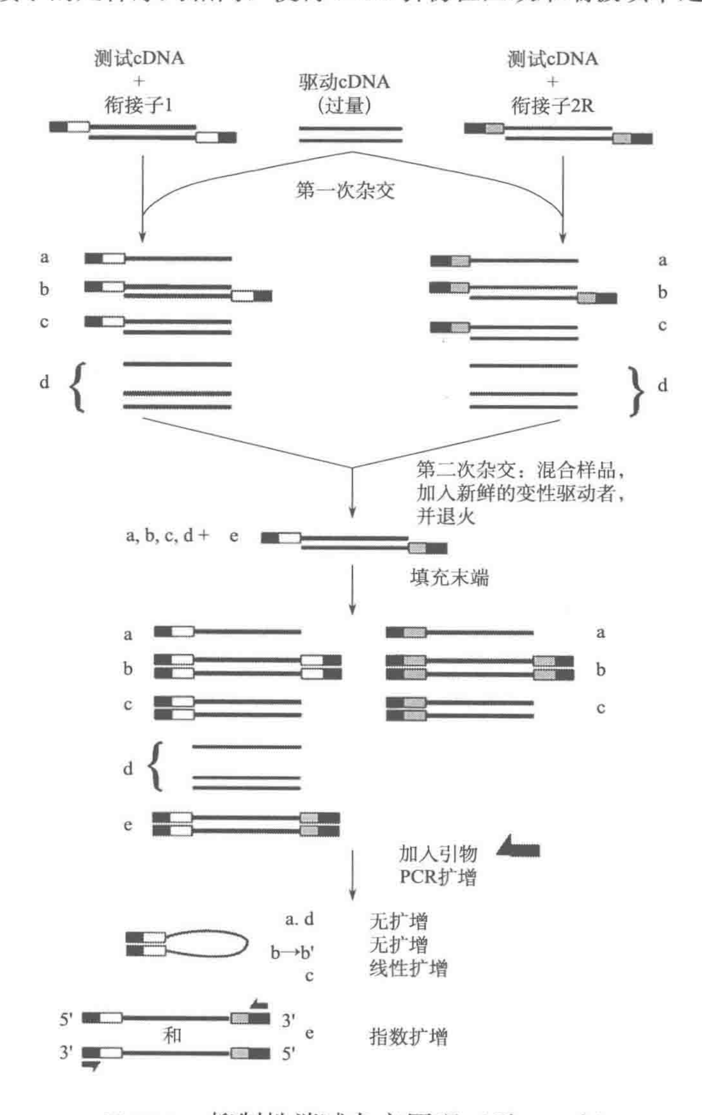


图 21.1　抑制性消减杂交原理（Clontech）

然后进行两次杂交。在第一次杂交中，向每个测试样品中加入过量的驱动样品。这些样品接着进行热变性并退火，每个样品产生 a、b、c 和 d 型分子（**图 21.1**）。使高、低丰度序列的 a 型分子的浓度相等，因为根据杂交的二阶动力学，含量丰富的序列退火更快。同时，富集差异表达序列的单链型 a 型分子，而未差异表达的 cDNA 与驱动样品杂交形成 c 型分子。

在第二次杂交中，将两个第一次杂交样品混合，不进行变性处理。这时，只有余下的已均等化的消减单链测验 cDNA 能够再结合并形成新的杂交。这些新的杂交是带有不同末端的双链测试分子，末端与衔接子 1 和 2R 的序列对应。加入新鲜变性的驱动 cDNA（同样不对消减混合物变性处理）以进一步富集差异表达序列 e。在 DNA 聚合酶填充末端后，e 型分子，即差异表达的测试序列，在其 5′端和 3′端对其嵌套引物有不同的退火位点。

然后对所有类型的分子进行 PCR，扩增所需的差异表达序列。在 PCR 中，a 和 d 型分子缺失引物退火位点，因此不能被扩增。由于 PCR 的抑制作用，大多数 b 型分子形成环状结构，不能够指数扩增。c 型分子只有一个引物退火位点，因此只能线性扩增。只有差异表达序列，即含有两个不同衔接子的 e 型分子，能够指数扩增。

接着，使用嵌套引物进行第二次 PCR 扩增，以进一步减少任何 PCR 背景产物并富集差异表达序列。cDNA 可直接插入 T/A 克隆载体中。此外，衔接子 I 上的 *Not* I 位点和衔接子 2R 上的 *Eag* I 位点能够用来克隆平整末端。证实单独的克隆确实代表差异表达基因的步骤很重要，这通常通过将随机选择的消减克隆与 Northern 印迹杂交，消减克隆，或斑点印迹阵列的差异筛选来实现。

21.3.1 一般考虑

我们基于 Diatchenko 的方法（***14***），使用的 Clonetech PCR-选择 cDNA 消减试剂盒。全部 RNA 提取对消减之前的 mRNA 和 cDNA 制备非常关键。我们使用植物组织提取 RNA。因此，建议对特定的物种使用适当的从细胞核组织中分离 RNA 的方法。

戴上手套以防止 RNA 和 cDNA 的样品被核酸酶降解。取较小体积时使用无气溶胶吸管，取较大体积时使用一次性无菌吸管量。

21.3.2 cDNA 第一链合成

（1）对每个测试和驱动样品，在无菌 0.5 mL 微量离心管中混合如下组分（不要使用聚苯乙烯管）。

poly (A)$^+$ RNA（2 μg）2～4 μL

cDNA 合成引物（10 μmol/L）1 μL

如有需要，加入无菌水至终体积为 5 μL。将各组分混合，并在微量离心机中稍加离心。

（2）将离心管置于热循环仪中，70℃ 孵育 2 min。

（3）将离心管置于冰上冷却 2 min。

(4) 简单离心。

(5) 向每个反应管中加入：

5×第一链缓冲液，2 μL

dNTP 混合物（每份 10 μmol/L），1 μL

无菌水，1 μL

AMV 逆转录酶（20 U/μL），1 μL

见注释 1。

(6) 轻轻振荡反应管并简单离心。

(7) 将管子置于空气培养箱中，42℃孵育 1.5 h。

(8) 立即将管子放在冰上以终止第一链 cDNA 合成，并迅速进行 21.3.3 节的步骤。

21.3.3　cDNA 第二链合成

对每个第一链测试者和驱动者进行以下步骤。

(1) 向第一链合成的反应管中加入以下组分（每管中原有 10 μL）：

无菌水，48.4 μL

5×第二链缓冲液，16.0 μL

dNTP 混合物（10 μmol/L），1.6 μL

20×第二链酶混合物，4.0 μL

(2) 混合并简单旋转反应管。最终体积应为 80 μL。

(3) 16℃孵育 2 h。

(4) 加入 2 μL（6 U）T4 DNA 聚合酶。将各组分混匀。

(5) 16℃孵育 30min。

(6) 加入 4 μL 20×EDTA/糖原混合液并混匀以终止第二链合成。

(7) 加入 100 μL 苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1。

(8) 彻底振荡，室温 14 000 r/min 离心 10 min。

(9) 小心将上层水相转移至洁净无菌 0.5 mL 微量离心管中，其两相界面和下层。

(10) 向水相中加入 100 μL 苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1。

(11) 重复**步骤（8）**和**（9）**。

(12) 加入 40 μL 4 mol/L NH_4OAc 和 300 μL 95%乙醇。迅速操作，不要将离心管存放在－20℃。

(13) 彻底振荡，室温 14 000 r/min 离心 10 min。

(14) 小心弃上清液（**注释 2**）。

(15) 加入 500 μL 80%乙醇，覆盖沉淀。

(16) 14 000 r/min 离心 10 min。

(17) 弃上清液。

(18) 风干沉淀 10 min 使残余的乙醇蒸发。

(19) 将沉淀溶于 50 μL 水中。

(20) 转移 6 μL 至新的离心管中。−20℃保存此样品。

(21) 继续进行 21.3.4 节的步骤。

21.3.4 *Rsa* Ⅰ 酶切

对每个实验中的双链测试和驱动 cDNA 进行以下步骤，将生成较短的带有平整末端双链 cDNA 片段，这些片段适合消减，并对衔接子连接很必要。

(1) 向离心管中加入如下试剂：

双链 cDNA，43.5 μL

10×*Rsa* Ⅰ 限制缓冲液，5.0 μL

Rsa Ⅰ (10 U/μL)，1.5 μL

(2) 简单振荡并离心以混合。

(3) 37℃孵育 1.5 h。

(4) 取 5 μL 酶切混合物，分析 *Rsa* Ⅰ酶切效率。

(5) 加入 2.5 μL 20×EDTA/糖原混合物以终止反应。

(6) 加入 50 μL 苯酚-氯仿-异戊醇混合液，体积比为 25∶24∶1。

(7) 彻底振荡。

(8) 20 000 *g* 离心 10 min 使两相分离。

(9) 取上层水相转移至洁净 0.5 mL 离心管中。

(10) 加入 50 μL 氯仿∶异戊醇 (24∶1)，彻底振荡。

(11) 14 000 r/min 离心 10min 使两相分离。

(12) 取上层水相转移至洁净 0.5 mL 离心管中。

(13) 加入 25 μL 4 mol/L NH_4OAc 和 187.5 μL 95%乙醇 (**注释 3**)。

(14) 振荡并完全混合。

(15) 室温 20 000 *g* 离心 20 min。

(16) 小心弃上清液。

(17) 轻轻加入 200 μL 80%乙醇，覆盖沉淀。

(18) 20 000 *g* 离心 5 min。

(19) 小心弃上清液。

(20) 风干沉淀 5～10 min。

(21) 将沉淀溶于 5.5 μL 水中，−20℃保存。将这 5.5 μL 经过 *Rsa* Ⅰ酶切的 cD-NA 样品作为实验用的驱动 cDNA。在接下来的实验步骤中，这些样品将与衔接子链接，产生测试 cDNA。

(22) 检查 *Rsa* Ⅰ酶切后的 cDNA (**注释 4**)。

21.3.5 衔接子连接

进一步的消减实验如**图 21.2A** 所示，目的是富集 poly (A)$^+$ RNA 样品中的差异表达序列 (cDNA 1，测试者)，但不富集 poly (A)$^+$ RNA 样品 (cDNA 2，驱动者)。**图 21.2B** 描述了逆向 (交互) 消减，其中 cDNA 2 为测试者，cDNA 1 为驱动者。将得到

两个消减的 cDNA 群体：①含有样品 1 特定序列的正向消减 cDNA。②含有样品 2 特定序列的逆向消减 cDNA。

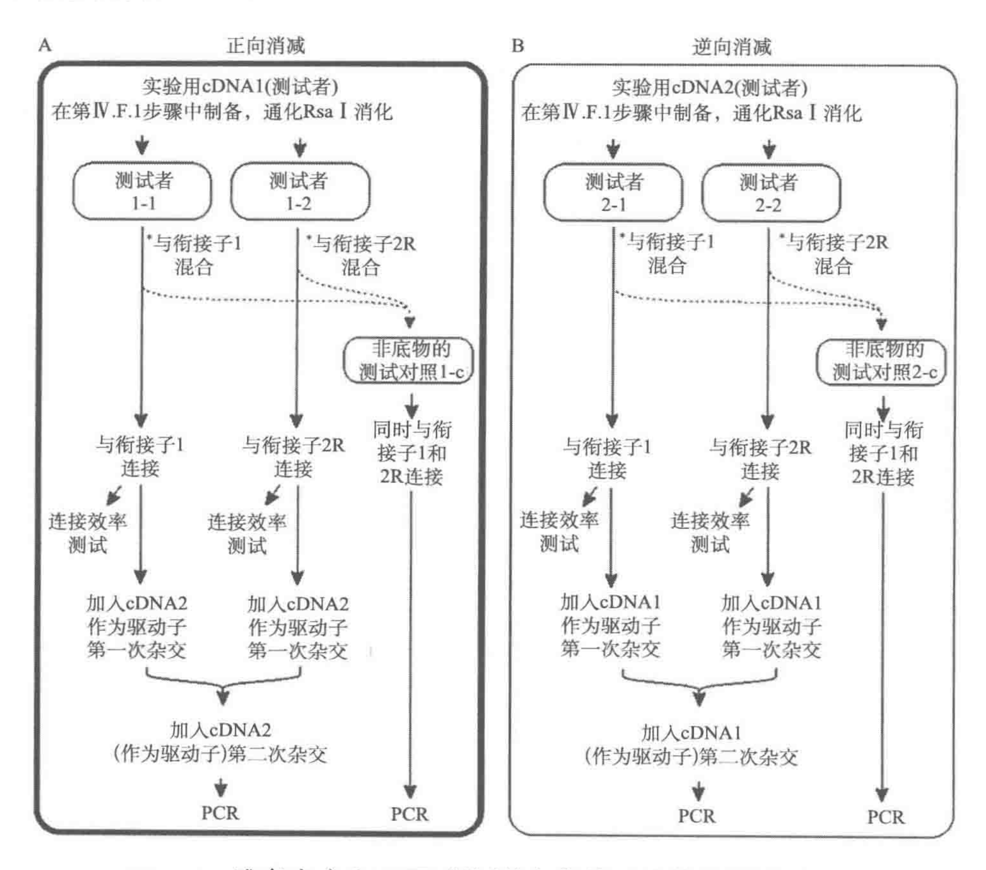


图 21.2　准备杂交和 PCR 所用的与衔接子连接的测试 cDNA

进行两个方向的消减需要准备与每个 poly (A)$^+$ RNA 样品相应的测试 cDNA。

将每个测试 cDNA 样品等分，装入两管中：一份与衔接子 1（测试者 1-1，2-1）连接，另一份与衔接子 2R（测试者 1-2，2-2）连接。建立连接反应后，混合每个测试管中的部分，使 cDNA 与两个衔接子连接（未消减测试对照 1-c，2-c）。未消减测试对照起初作为连接的阳性对照，之后作为消减的阴性对照（**注释 5**）。

注意：衔接子不会与驱动 cDNA 连接。

(1) 用 5 μL 蒸馏水稀释 1 μL *Rsa* Ⅰ 酶切的实验 cDNA [见 21.3.4 节，**步骤 (21)**]。准备与衔接子连接的测试 cDNA。

(2) 在 0.5 mL 微量离心管中混合一下试剂配制连接混合液。为确保足够的用量，按比全部连接反应多一次的用量配制。

每次反应需要：

无菌水，3 μL

5×连接缓冲液，2 μL

T4 DNA 连接酶（400 U/μL），1 μL

T4 DNA 连接酶中有连接所需的 ATP。

（3）对每个实验测试 cDNA，在 0.5 mL 离心管中照**表 21.1** 按顺序混合各试剂。吹吸以完全混合。同样方法处理测试者 2-1 和 2-2。

（4）在新的微量离心管中混合 2 μL 测试者 1-1 和 2 μL 测试者 1-2。连接完成后，这管成为未消减对照 1-c。同样方法处理其他的实验测试 cDNA。连接后，对照管中的未消减测试 cDNA 分子中，约 1/3 将带有两个不同的衔接子。

（5）简单离心，16°C 孵育过夜。

（6）加入 1 μL EDTA/糖原混合液以终止连接反应。

（7）72℃加热样品 5 min 使连接酶失活。

（8）简单离心，准备实验用与衔接子连接的测试 cDNA。此时未消减测试对照已完成。

（9）从每个未消减测试对照（1-c）中取 1 μL，用 1 mL 水稀释。这些样品将用于 PCR。

（10）−20℃下保存样品。

表 21.1　准备连接反应

成分	管 1 测试者 1-1/μL	管 2 测试者 1-2/μL
稀释测试 cDNA	2	2
衔接子 1（10 μmol/L）	2	—
衔接子 2R	—	2
Master Mix	6	6
最终体积	10	10

21.3.6　第一次杂交

接下来的步骤中，向每个测试 cDNA 中加入过量驱动 cDNA，热变性样品并退火。由于测试和驱动 cDNA 中的非目标 cDNA 形成杂交物，余下的单链 cDNA（第二次杂交可用）中的差异表达序列显著富集。

重要事项：确保杂交之前，4×杂交缓冲液已至少室温预热 15～20 min。使用缓冲液之前要确保其中没有明显的颗粒或沉淀。如有需要，37°C 加热缓冲液 10 min 以溶解沉淀。

（1）对每个实验消减，向 0.5 mL 离心管依照**表 21.2** 按顺序加入试剂。

（2）加入一滴矿物油覆盖样品，简单离心。

（3）在热循环仪 98°C 孵育 1.5 min。

（4）68℃孵育样品 8h，立即进行 21.3.7 节的步骤（**注释 6**）。

同样方法处理测试者 2-1 和 2-2。

表 21.2　准备第一次杂交

成分	杂交样品 1/μL	杂交样品 2/μL
Rsa Ⅰ酶切的驱动 cDNA [21.3.4 节，**步骤 (21)**]	1.5	1.5
衔接子 1 连接的测试 1-1 [21.3.5 节，**步骤 (18)**]	1.5	—
衔接子 2R 连接的测试 1-2 [21.3.5 节，**步骤 (8)**]	—	1.5
4×杂交缓冲液	1.0	1.0
总体积	4	4

21.3.7　第二次杂交

将第一次杂交的两个样品混合，加入刚变性的驱动 DNA，进一步富集差异表达序列。形成的新杂交分子为两端带有不同衔接子的差异表达 cDNA。

重要事项：不要使这一阶段的第一次杂交样品变性。另外，不要将样品拿出热循环仪超过加入新鲜驱动者所需时间。对每个实验测试 cDNA 重复以下步骤。

(1) 向洁净离心管中加入如下试剂：

驱动 cDNA [21.3.4 节，**步骤 (21)**]，1 μL

4×杂交缓冲液，1 μL

无菌水，2 μL

(2) 取 1 μL 上述混合物，加入 0.5 mL 微量离心管中，加入一滴矿物油覆盖之。

(3) 在热循环仪中 98℃ 孵育 1.5 min。

(4) 从热循环仪中取出刚变性的驱动者。使用以下步骤将驱动者与杂交样品 1 和 2 同时混合（在 21.3.6 节中制备；见**表 21.2**）。

这确保两个杂交样品只在刚变性的驱动者的存在下混合。

(a) 将微量移液器设定为 15 μL。

(b) 在装有杂交样品 2 的离心管中，将移液器尖端轻轻接触矿物油/样品界面。

(c) 小心将全部样品部分吸出。不必担心会同时吸出少量矿物油。

(d) 从离心管中取出移液器，再吸入少量空气，使样品滴下面的移液器尖端有少量空气。

(e) 对含有刚变性驱动者的离心管重复**步骤(b)～(d)**。移液器尖端应含有由少量空气将两种样品隔开。

(f) 将全部混合物转移至含有杂交样品 1 的离心管中。

(g) 上下吹吸以混合。

(5) 如有需要，简单离心。

(6) 68℃反应过夜。

(7) 加入 200 μL 稀释缓冲液，用移液枪混合。

(8) 在热循环仪中 68℃ 加热 7 min。

(9) －20℃保存。

21.3.8 PCR 扩增

本节所述的反应将选择性扩增差异表达的 cDNA。热循环之前，75°C 的简短孵育将填补衔接子缺失的链。这将生成 PCR 引物 1 结合位点。第一次扩增中，只有两端带有不同衔接子序列的双链 cDNA 才能指数扩增。第二次扩增中，使用嵌套 PCR 进一步减少背景，富集差异表达序列。进行 PCR：①正向消减实验 cDNA 的实验。②未消减测试对照（1-c）。③逆向消减实验 cDNA。④逆向未消减测试对照（2-c）项。⑤PCR 对照消减 cDNA（试剂盒提供）。PCR 对照消减 cDNA 提供阳性 PCR 对照，并含有 *Hea* Ⅲ酶切的 ΦX174 DNA 成功消减混合物。建议对反应中使用的酶做阳性和阴性对照。

需使用热启动：①准备不含 *Taq* 酶的第一次 PCR 混合物；②混合 PCR 样品，将反应混合物 75℃加热 1 min；③快速加入所需量的 *Taq* 聚合酶；④75℃孵育 5 min 进行反应；⑤进行如下**步骤（8）**所述的 PCR 反应。

（1）准备 PCR 模板。

（a）向标记好的离心管中分装 1 μL 稀释的 cDNA（每个消减的样品和对应的未消减测试对照的稀释）。

（b）向标记好的离心管中分装 1 μL PCR 对照消减 cDNA（试剂盒提供）。

（2）为确保足够的用量，按比全部反应多一次的用量配制 Master Mix，每个反应所需的混合物依照**表 21.3** 按顺序混合各试剂。

（3）振荡以混合均匀，简单离心。

（4）向步骤 1 准备好的每个反应管中加入 23.5 μL Master Mix。

（5）用 50 μL 矿物油覆盖。

（6）在热循环仪中 75℃孵育反应混合物 1 min。每管加入 0.5 μL *Taq* 聚合酶。

（7）在热循环仪中 75℃孵育反应混合物 5 min 以延长衔接子（注意不要从热循环仪中取出样品）。

（8）立即开始热循环：

31 个循环：

94°C 30 s

66°C 30 s

72°C 1.5 min

（9）从每管中取出 8 μL，在 1×TAE 缓冲液中，2%琼脂糖/溴乙烷凝胶上进行电泳（**注释 7**）。

（10）用 27 μL 水稀释每个 3 μL 的第一次 PCR 混合物。

（11）将**步骤（10）**所得的稀释后的第一次 PCR 产物分装在标记好的离心管中，每管 1 μL。

（12）为确保足够的用量，按比全部反应多一次的用量配制 Master Mix，每个反应所需的混合物依照**表 21.4** 按顺序混合各试剂。

（13）振荡以混合均匀，简单离心。

(14) 向步骤 11 准备好的每个反应管中加入 23.5 μL Master Mix。

(15) 用 50 μL 矿物油覆盖。

(16) 立即开始热循环：

94℃ 30 s

停留在 68℃并向每个离心管中加入 0.5 μL Taq 聚合酶

68℃ 30 s

16 个循环：

94℃ 30 s

68℃ 30 s

72℃ 1.5 min

(17) 从每管中取出 8 μL，在 1×TAE 缓冲液中，2%琼脂糖/溴乙烷凝胶上进行电泳（**注释 8**）。

(18) −20℃保存反应产物。

表 21.3　第一次 PCR Master Mix

试剂	每次反应的用量/μL
无菌水	19.5
10×PCR 缓冲液	2.5
dNTP 混合物（10 mmol/L）	0.5
PCR 引物 1（10 mmol/L）	1.0
总体积	23.5

表 21.4　第二次 PCR Master Mix

试剂	每次反应的用量/μL
无菌水	18.5
10×PCR 反应缓冲液	2.5
dNTP 混合物（10 mmol/L）	0.5
嵌套 PCR 引物 1（10 mmol/L）	1.0
嵌套 PCR 引物 2R（10 mmol/L）	1.0
总体积	23.5

此时 PCR 混合物中已经富集了差异表达的 cDNA，原始 mRNA 样品中丰度不同的差异表达副本的含量也大致相等。

21.3.9　克隆和 Northern RNA 印迹法

将 SSH 产生的 cDNA 克隆到 T/A 克隆载体上，将质粒转入大肠杆菌。对每个菌落进行 PCR 分析，用 1%琼脂糖凝胶分离并确定 PCR 产物（**图 21.3**）。培养相关的菌落以分离质粒，−80℃保存菌落样本供进一步研究。分离每个菌落的质粒之后的 DNA 序列分析是基因识别的重要步骤。

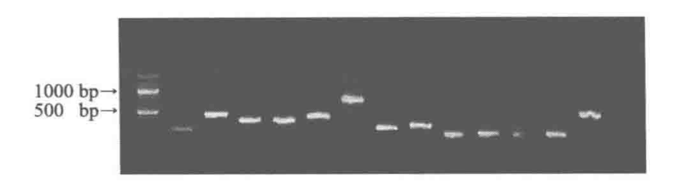


图 21.3　由抑制性消减杂交文库中的不同 cDNA 克隆的 PCR 产物。PCR 产物由溴乙烷染色的 1%琼脂糖凝胶分离。包含插入的克隆显示出 PCR 产物的条带

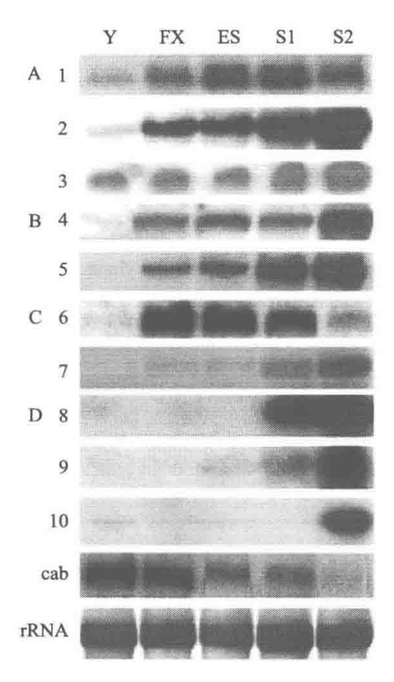


图 21.4　各种衰老相关基因（SAG）的时空表达谱。从以下阶段叶片中提取 RNA：Y-嫩叶（young），FX-完全成熟，ES-衰老早期，并在如下逐渐衰老的阶段：S1、S2、S3（A）衰老前有基础表达的 SAG；（B）早期表达的基因；（C）表现出短暂表达的 SAG；（D）晚期表达 SAG。Cab——编码叶绿素 a-b 结合蛋白的光合作用基因，是一个下调衰老的基因。底部一格显示的 18s rRNA 为上样对照（**参考文献 13**）

使用 SSH 方法确定与拟南芥叶片衰老相关基因，发现了数百个衰老相关的基因。Northern 印迹分析表明不同的基因表现出诸如早期表达或晚期表达的不同时序表达模式（**图 21.4**）。

21.4　注释

（1）为了监测 cDNA 合成进展，用 9 μL 水稀释 1 μL［α^{32}P］dCTP（10 mCi/mL），将上文的水替换成 1 μL 稀释的标记物。

（2）若使用［α^{32}P］dCTP，对沉淀使用盖革计数器。

（3）立即沉淀。不要在－20℃保存离心管。在此温度下的长期储存可能造成有害盐类的析出。

（4）将 2.5 μL 未酶切的双链 cDNA（21.3.4 节中）和 5 μL *Rsa* Ⅰ酶切的 cDNA（21.3.4 节中）在 1×TAE 缓冲液中，1%琼脂糖/溴乙烷凝胶上进行电泳。由 poly（A）$^+$ RNA 得到的 cDNA 在 0.5～20 kb 处显示出印迹。明亮的条带与含量丰富的 mRNA 或 rRNA 相对应。*Rsa* Ⅰ酶切后，cDNA 的平均长度较小（0.1～2 kb）。如果样品的大小分布在 *Rsa* Ⅰ酶切后没有变化，则重复苯酚/氯仿萃取、乙醇沉淀和消化步骤。如果使用［α^{32}P］dCTP，可以将凝胶暴露在增强磷光屏下过夜使结果可见。

（5）在步骤的其余部分，确保使用文中给出的命名标记离心管。用产生中间产物的步骤编号标记离心管也可能有助于实验。

（6）杂交样品所需时间可能短至 6 h，或长达 12 h。孵育时间不要超过 12 h。

（7）实验第一次 PCR 消减产物通常在 0.5～20 kb 处显示出印迹，可能有或没有明

显的条带。如果印迹不可见，则需重复 PCR，同时做出一些调整。例如，多进行 3 个周期，或者把退火温度降低至 64℃。有时需要重复几次才能成功。

（8）实验消减样品印迹中可能带有或不带有明显条带。然而，如果只能看到非常清晰的条带，这可能暗示几个克隆主导了整个基因文库。因此，必须重复第一次和第二次 PCR，否则大多数菌落将包含多余的序列。

参考文献

1. Buchanan-Wollaston, V. (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in Brassica napus. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiol.* **105**, 839-846.
2. Drake, R., John, I., Farrell, A., Cooper, W., Schuch, W., and Grierson, D. (1996) Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **30**, 755-767.
3. Park, J. H., Oh, S. A., Kim, Y. H., Woo, H. R., and Nam, H. G. (1998) Differential expression of senescence-associated mRNAs during leaf senescence induced by different senescence-inducing factors in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **37**, 445-454.
4. Smart, C. M., Hosken, S. E., Thomas, H., Greaves, J. A., Blair, B. G., and Shcuch, W. (1995) The timing of maize leaf senescence and characterization of senescence-related cDNAs. *Physiologia Plantarum* **93**, 673-682.
5. Buchanan-Wollaston, V. and Ainsworth, C. (1997) Leaf senescence in Brassica napus: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol. Biol.* **33**, 821-834.
6. Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., et al. (2001) Dark-inducible genes from Arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol. Plant* **111**, 345-352.
7. Hajouj, T., Michelis, R., and Gepstein, S. (2000) Cloning and characterization of a receptor-like protein kinase gene associated with senescence. *Plant Physiol.* **124**, 1305-1314.
8. Kleber-Janke, T. and Krupinska, K. (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta 203*, 332-340.
9. Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I., and Watanabe, A. (2001) Isolation and RNA gel blot analysis of genes that could serve as potential molecular markers for leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **42**, 170-178.
10. Page, T., Griffiths, G., and Buchanan-Wollaston, V. (2001) Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* **125**, 718-727.
11. Guterman, A., Hajouj, T., and Gepstein, S. (2003) Senescence-associated mRNAs that may participate in signal transduction and protein trafficking. *Physiol. Plant* **118**, 439-446.
12. Hinderhofer, K. and Zentgraf, U. (2001) Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta* **213**, 469-473.
13. Gepstein, S., Sabehi, G., Carp, M. J., et al. (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J.* **36**, 629-642.
14. Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., et al. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6025-6030.

第22章 定位影响果蝇寿命自然差异的遗传多态性

Mapping Genetic Polymorphisms Affecting Natural Variation in Drosophila Longevity

Maria De Luca，Jeff Leips

摘要 在模式生物中对影响寿命的突变的分析揭示了很多在进化保守的信号通路中调控寿命的基因。这些研究表明，参与胰岛素样信号通路、代谢、应激反应、防止氧化损伤的基因影响寿命。然而，我们不清楚这些候选基因的功能多态性是否影响种群寿命的差异性。为了确定造成寿命差异性的自然发生的分子多态性，必须首先定位数量性状基因（QTG），接着对从自然种群中收集的大量等位基因样品进行连锁不平衡遗传分析。两个品系图谱之间，QTG影响寿命的异染色体区域称为数量性状位点数量性状位点（QTL）。全基因组重组定位可以很好地确定QTL，但很难达到单个基因的水平。本章详细介绍定量互补试验和连锁不平衡定位实验，以确定基因位置以及由基因多态性决定的果蝇寿命差异。

关键词 定量互补试验；缺陷型群体；连锁不平衡定位；单核苷酸多态性；染色体代换系

22.1 引言

利用突变和转基因动物在模式生物中的研究表明，寿命受到负责代谢效率、促进活力以及耐受应激的基因影响（在**参考文献 *1～3*** 中综述）。然而，难以通过这些研究理解自然种群中寿命变异的遗传原因，而这对理解物种的维持和进化非常重要。寿命是一个复杂的数量性状，已经证实，自然种群中存在分离的寿命的遗传差异，遗传率在10％～30％（***4***）。因此，数量遗传方法是解决自然种群维持和进化相关问题的一个方法。这种方法能够确定引发寿命自然变异的位点，并估计这些位点在遗传背景和不同环境中的相对效果。确定自然发生的影响寿命的遗传差异的数量遗传方法包括两步。首先产生两个品系寿命差异的数量性状基因（QTG）。接着对从自然种群中收集的大量等位基因样品进行连锁不平衡（LD）定位，确定候选基因中导致寿命差异的分子多态性（数量性状核苷酸，QTN）。候选基因的确定始于使用 F_2 种群的重组定位、信息回交或由两个显示出不同寿命的祖先品系产生的重组自交系。能够确定含有导致两个祖先品系之间寿命差异的位点（数量性状位点，QTL）的染色体区域。QTL定位的方法应用在多种生物体（包括人类）。衰老研究中检测QTL的详细方法见本书第23章。然而，在

大多数生物中，仅从 QTL 定位结果确定候选位点是存在问题的，因为 QTL 边界的置信区间往往很大，通常包含数十至数百个基因（**5**）。在果蝇中，能够检测：①一条染色体上的缺陷或缺失以改进感兴趣的 QTL 区域。②候选基因的空突变等位基因以检测 QTG 的候选资格的定量互补试验，较为直接地确定候选基因（**5**）。缺陷型果蝇市面上有售，能够从 Bloomington，Indiana 以及瑞典的 Umea 买到（另见本书第 10 章以得到进一步的细节）。不同缺陷型果蝇缺失的基因的大小和位置都已知。得到一系列涵盖感兴趣的 QTL 区域的缺陷型之后，就可以如**图 22.1** 所示，检测每个小缺失的作用。对最初确定的较大 QTL 中的每个小缺失进行序贯检验可以将感兴趣的区域缩小至可控大小以确定候选基因（**图 22.2**）。如果可以得到一个突变种群，在位于 QTL 边界的特定基因上突变，则对其进行与缺陷测试类似的互补测试，以确定位置候选基因（**6**）。可能出现的问题是在缩小之后的染色体区域中没有候选基因的突变。伯克利果蝇基因组计划不断努力开发所有已知果蝇基因中 *P*-元素突变的精确定位，这将大大改善这种局限性。最近研究人员也开发出新方法和资源，能够得到带有可预测末端的对目标区域的自定义删除（**7**），从而产生自己的群落，用来检测假定候选基因对差异的作用。

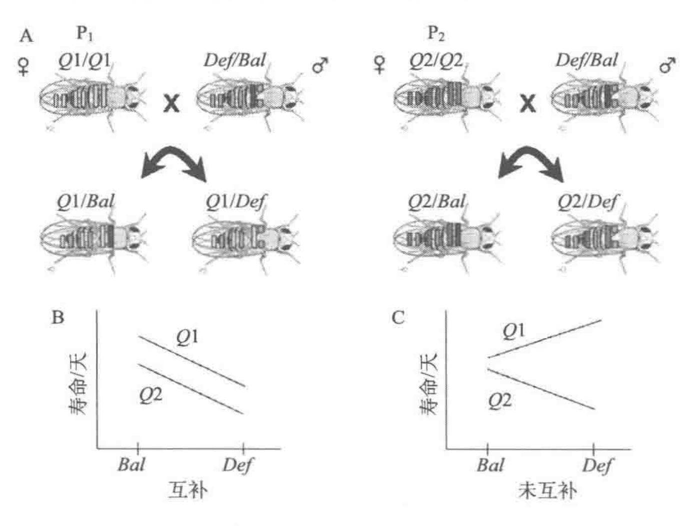


图 22.1　定量互补试验原理

(A) 将每个亲本品系（P_1 和 P_2）中的未交配雌果蝇与缺陷型（*Def*）雄果蝇交配。纯合 *Def* 染色体致死，因此将其维持在完整的同源平衡器（*Bal*）染色体中以避免重组。平衡器染色体含有显性可见突变（如翘翅），因此，杂交之后，可以区分带有平衡子染色体的后代与带有 *Def* 的后代。这些杂交产生的 F_1 可分成 4 种基因型：Def/Q_1，Bal/Q_1，Def/Q_2，Bal/Q_2，其中 Q_1 和 Q_2 分别表示 P_1 和 P_2 的数量性状基因。对 Q_1 和 Q_2 等位基因能否与缺陷互补的定量失败检测，即计算 $Def/Q_1 - Def/Q_2 -$（Bal/Q_1- Bal/Q_2）是否与零有显著性差异。这在双向方差分析（ANOVA）中通过品系（P_1 和 P_2）间相互作用的统计杂交来检测；(B) 因为 P_1 和 P_2 寿命之间的相对差异相同，在 *Def* 位置推断不出 QTL。*Def* 不能揭示 Q_1 和 Q_2 等位基因作用之间的差异；(C) 在 *Def* 位置推断出了一个 QTL。这种情况下，Q_1 和 Q_2 等位基因对缺陷的平均特征值差异超过了 Q_1 和 Q_2 等位基因对平衡器的平均特征值差异。因此在这个位置可以推断一个 QTL。定量互补试验中需要注意的是，这个测试不能区分两种不同类型的相互作用：①由 *Def* 区域中 *Def* 和 QTL 等位基因的相互作用（等位基因性）；②两个品系基因组中 *Def* 和 QTL 等位基因在其他位置的相互作用（上位性）。因此，定位的基因直接或通过与其他位点的相互作用影响两个品系之间的性状差异

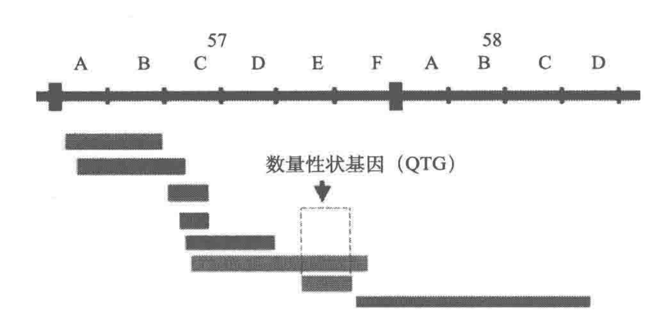


图 22.2　对含有一个假定的影响寿命差异的 QTG 的果蝇染色体区域（57A～58D）的定量缺陷定位。长小节和短小节对多线染色体进行了亚分割。绿色条带表示非显著缺陷；橘色条带对应在数量性状上没能与 P_1 和 P_2 QTL 互补的缺陷。虚线框表示影响 P_1 和 P_2 定位之间的性状差异的一个 QTL 区域

一旦确定了 QTG，可以在随机交配种群中进行 LD 定位，从而在分子遗传学水平上表征寿命自然差异的遗传基础。LD 定位方法检测 QTG 中多态性标志物和寿命表型差异之间的统计关联。如果一个候选基因上的多态性位点与数量性状表型的差异相关，这个位点就可能是 QTN 或位于 QTN 的 LD 中。LD 表示配子不同位点等位基因的非随机关联，因而不能直接证明研究中候选多态性的等位基因差异导致表型差异。由于 LD 能够通过最近的种群混合、选择、近亲繁殖产生，因此真正的多态性位点可能与 LD 研究中确定的位点相连（***5***）。多态性位点之间的 LD 会随时间缩短，缩短速度是重组分数的函数，因此长时间之后，只有和多态性紧密相连的部分会留在 LD 中。因此，在 QTG 中通过多态性标志物的高密度定位能够发现 QTN。正式确认所识别的多态性对表型影响之前，需要进行额外的基因操纵（如同源重组）检查在不同遗传学背景下候选基因的其他等位基因对表型的影响（***5***）。本章概述的定位步骤已证实能够确定我们关注的候选基因。

Trudy Mackay 实验室进行了大量工作，使用本章所述的重组定位和定量互补方法了解导致自然发生的果蝇寿命差异的遗传学基础。多巴脱羧酶基因（*Ddc*）编码催化多巴胺和 5-羟色胺这两种生物胺合成的最后一步的脱羧酶（***8***），被确定为影响果蝇寿命的候选基因。首先使用缺陷定位，将 QTL 区域缩小至一个含有生物胺合成通路基因的 50 kb 区间（***9***）。然后对 3 个 *Ddc* 等位基因进行互补试验来说明 *Ddc* 是这些品系寿命相关的位置候选基因。最后使用从来自 Raleigh，NC 的自然果蝇种群中建立 2 号染色体替代品系（chromosome 2 substitution lines，C2SL）检测 *Ddc* 基因上自然发生的多态性对未交配果蝇寿命的影响（***10***）。野外捕获的果蝇产生了 173 个单雌系，通过标准果蝇杂交，将每个单雌系的 2 号染色体替换为 Samarkand [*Sam*] 品系的共同遗传背景，构建 C2SL（***10***）。对 C2SL 中 14 个寿命不同品系的 *Ddc* 进行完全测序，以确认用来筛选全套 173 个等位基因的遗传标志物的单核苷酸多态性（SNP）。使用**参考文献 *12*** 中描述的 Pyrosequencing 技术确定其余品系的 SNP 位点。这些 C2SL 被划分成 36 个基因型标志物。3 个常见的 SNP：T420C、C1685A 和 T2738G，都在强 LD 中，都与自然发生

的寿命差异相关（***9***）。在整个5.5 kb区域中的强LD，包括*Ddc*转录单位，妨碍我们推断导致观察到的寿命差异的QTN。需要进一步的研究以证明*Ddc*的分子多态性导致寿命差异。重要的一点是，果蝇中类似的乙醇脱氢酶（ADH）活性（***13***）以及刚毛数差异（***6***）的研究支持了我们的整体研究结果，即单个位点中的多重变化与自然发生的表型差异相关。如果多重的位点内作用和相互作用是QTL的规则，果蝇作为研究的模型系统将在确定自然发生的导致寿命差异的基因变异中发挥重要作用。确定这些变异将使我们更好地理解自然种群中维持寿命差异的机制。

解释下文描述的寿命研究时需要注意一点，即影响寿命的基因位点未必也影响衰老或老化（随年龄的生理退化）速率。任何基于遗传不依赖年龄的影响生存率的表型性状差异（如交配频率、繁殖输出）都将导致寿命的不同。因此，许多影响寿命差异的基因可能并不影响衰老速率。确定了影响寿命的候选基因之后，需要进行后续实验以确定这些位点的等位基因变异是否也导致特定年龄的健康状况下降速率的差异，或造成与年龄无关的提高死亡率的因素的差异。

22.2　材料

22.2.1　缺陷和突变的定量互补试验

（1）两个祖先品系，产生用来定位QTL的分离种群。

（2）果蝇群体（**注释1**）。

（3）SAS软件（SAS Institute，Inc.，NC）。

22.2.2　连锁不平衡定位

1. 测序

（1）Gentra DNA分离试剂盒（GENTRA SYSTEMS，Minneapolis，MN）。

（2）0.2 mL，96孔PCR板（PE Applied Biosystems，CA）。

（3）PCR试剂：10×PCR缓冲液；2 mmol/L dNTP；25 mmol/L $MgCl_2$；10 μmol/L正向和反向引物；5 U/μL *Taq* DNA聚合酶（PE Applied Biosystems，CA）。

（4）标准琼脂（Sigma-Aldrich，Inc.）。

（5）10×TAE缓冲液：96.8 Trizma® Base，40 mL 0.5 mol/L EDTA pH 8.0，22.84 mL冰醋酸；加水至400 mL（pH 8.0～8.1）。

（6）10 mg/mL溴化乙锭（Sigma，St. Louis，MO）。

（7）DNA梯（Invitrogen）。

（8）QIAquick 96 PCR纯化试剂盒（Qiagen，Hilden，Germany）。

（9）ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready反应混合物（PE/Applied Biosystems，Foster City，CA）（**注释4**）。

（10）无边缘0.2 mL 96 PCR板（PE Applied Biosystems，CA）。

（11）每种引物10 μmol/L。

（12）70%乙醇（Sigma-Aldrich，Inc.）。

（13）甲酰胺（Sigma-Aldrich，Inc.）。

（14）DNA 比对软件。

2. 基因型测定：Pyrosequencing

（1）PCR 试剂：1×PCR 缓冲液；2.5 mmol/L dNTP；25 mmol/L $MgCl_2$；10 μmol/L下游和上游引物（**注释 5 和 6**）；5 U/μL AmpliTaqGold 聚合酶（PE Applied Biosystems，CA）。

（2）0.2 mL，96 孔 PCR 板（PE Applied Biosystems，CA）。

（3）平板封口机（PE Applied Biosystems，CA）。

（4）Pyrosequencing 仪器，PSQ96（Pyrosequencing AB，Uppsala，Sweden）。

（5）Thermomixer R（Eppendorf，Hamburg，Germany）。

（6）链霉抗生素蛋白包被的琼脂糖凝胶微珠（Pyrosequencing AB，Uppsala，Sweden）。

（7）结合缓冲液 pH 7.6（10 mmol/L Tris-HCl，2 NaCl，1 mmol/L EDTA，0.1% Tween-20）。

（8）变性溶液（0.2 NaOH）。

（9）洗涤缓冲液 pH 7.6（10 mmol/L Tris-乙酸）。

（10）退火缓冲液 pH 7.6（20 mmol/L Tris-乙酸，2 mmol/L $MgAc_2$）。

（11）3 μmol/L Pyrosequencing 引物（**注释 7**）。

（12）96 孔过滤板（Millipore，Bedford，MA）。

（13）96 孔 PSQ96 板（Pyrosequencing AB，Uppsala，Sweden）。

（14）PSQ96 试剂盒（Pyrosequencing AB，Uppsala，Sweden）。

（15）SQA 柱（Pyrosequencing AB，Uppsala，Sweden）。

22.3 方法

22.3.1 缺陷和突变的定量互补试验

定量互补试验原理见**图 22.1**。

1. 寿命表现型

（1）将每个亲本品系的 10 只未交配的雌果蝇与每个缺陷群体或突变群体的 8 只雄果蝇交配（**注释 2**）。

（2）25℃，相对湿度 60%～75%，12 h 日夜周期条件下，使用添加活酵母的标准玉米粉/琼脂/糖饲料饲养果蝇。

（3）交配产卵 4 天之后除去成年果蝇。

（4）第 12～13 天时，随机收集相同基因型的同性未交配果蝇，将其置于含有约

5 mL不含活酵母的标准玉米粉/琼脂/糖饲料的瓶中。

（5）为每种基因型以及每种性别设置 5 个重复瓶，每瓶装有 5 只未交配果蝇，因此每种基因型共有雌雄果蝇各 25 只（**注释 3**）。

（6）每 5 天将果蝇转移到新鲜培养基中，每天记录每管中死去的果蝇数。

2. 数据分析

（1）将果蝇从羽化之日到登记死亡的前一天记为生存天数，以此估计寿命。

（2）用 GLM SAS 步骤通过双向混合模型的方差分析（ANOVA）单独分析每种性别的数据：

$$y=\mu+L+G+L\times G+R\ (L\times G)\ +E$$

其中，μ 是总平均数；L 是品系（P_1 或 P_2）的主要固定影响；G 是基因型（*Def* 或 *Bal*）的主要固定影响；E 是误差项；R（$L\times G$）表示在分析中对每个品系设置了重复瓶，以消除瓶的影响。品系 X 基因型（$L\times G$）这一显著的相互影响的项表示互补失败。在解释这一类型的分析结果时通常还用到另外一个的准则，即每个品系相对于缺陷型的平均表型差异（$P_1/Def-P_2/Def$）必须大于每个亲本染色体与平衡子的平均表型差异（$P_1/Bal-P_2/Bal$）。亲本染色体与平衡子之间的较大差异表明亲本品系的 QTL 与平

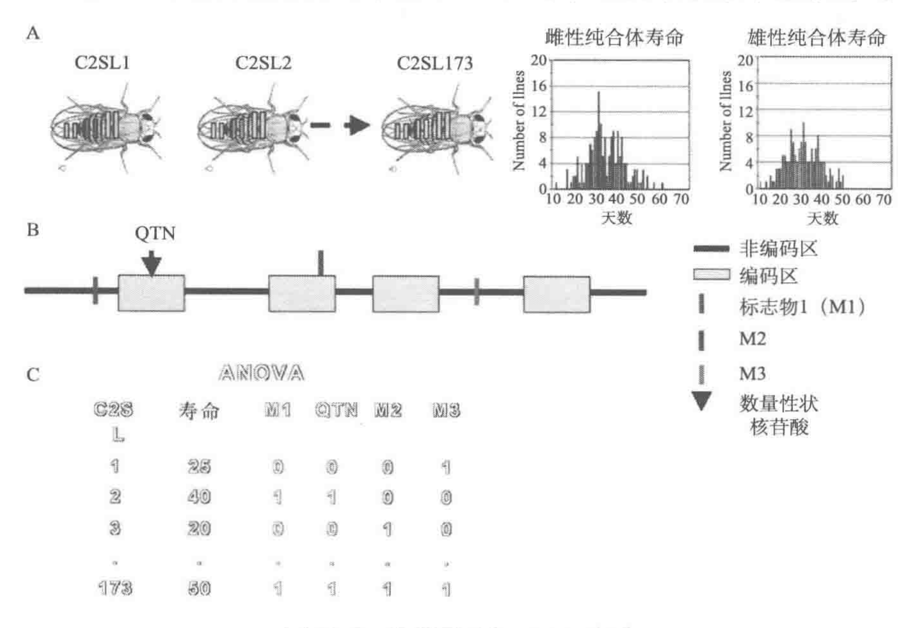


图 22.3　连锁不平衡（LD）定位

（**A**）分别评估雌雄果蝇每个同基因的染色体 2 替代品系（C2SL）的寿命；（**B**）由 15～20 个 C2SL 品系对每个候选数量性状基因（QTL）完全测序以确定单核苷酸多态性（SNP）。这些 SNP 将作为遗传标志物通过 Pyrosequencing 技术（12 中表述）筛选全套 C2SL；（**C**）对所有 C2SL 收集每个 SNP 位点的有关寿命和核苷酸变体（记为 0 和 1）。用方差分析（ANOVA）检测 QTG 中多态性标志物和寿命表型差异之间的联系。本图为显示在 M1 和 QTN（白色）与寿命表型差异之间有显著的统计学关联的示例，其中记为 0 的等位基因缩短寿命，而记为 1 的延长寿命。然而，M1 与 QTN 连锁不平衡（LD），而后者则是因果变量

衡子染色体上的基因之间有上位相互作用（***14***）。

22.3.2 连锁不平衡定位

LD 原理见**图 22.3**。

1. 寿命表型

（1）将每个 C2SLl 的 10 只雌果蝇与相同品系的 8 只雄果蝇交配（**注释 8**）。

（2）25℃，相对湿度 60%～75%，12h 日夜周期条件下，使用添加活酵母的标准玉米粉/琼脂/糖饲料饲养果蝇。

（3）交配产卵 4 天之后除去成年果蝇。

（4）第 12～13 天时，随机收集相同基因型的同性未交配果蝇，将其置于含有约 5 mL不含活酵母的标准玉米粉/琼脂/糖饲料的瓶中。

（5）为每种基因型以及每种性别设置 5 个重复瓶，每瓶装有 6 只未交配果蝇，因此每种基因型共有雌雄果蝇各 30 只。

（6）每 5 天将果蝇转移到新鲜培养基中，每天记录每管中死去的果蝇数。

2. DNA 分离

Gentra DNA 分离试剂盒（GENTRA SYSTEMS，Minneapolis，MN）能够分离1～700 只果蝇的 DNA。依照 PUREGENE DNA 分离试剂盒（GENTRA Systems，Minneapolis，MN）提供的说明分离 DNA。根据分离时使用的果蝇数目，预期得到 0.3～700 μg DNA。采用分光光度法对 DNA 进行定量。

3. DNA 扩增和测序

使用已发表的果蝇序列设计 PCR 引物，扩增基因区域的重叠部分。使用一套间隔约为 200 bp 的内部引物和 ABI Big Dye 终止子化学直接对 PCR 产物的两条链测序。

（1）混合如下试剂准备 100 次反应所需的 PCR Master Mix：1.24 mL 纯水；250 μL 10×PCR 缓冲液；150 μL 2.5 mmol/L dNTP；150 μL 25 mmol/L $MgCl_2$；100 μL10 μmol/L 正向引物；100 μL 10 μmol/L 反向引物；10 μL *Taq* DNA 聚合酶。

（2）将 5 μL 每种 DNA（200 ng）放入 0.2 mL 96 孔 PCR 板的每个孔中，并向每孔中加入 20 μL Master Mix。设置一组阴性对照，用 5 μL 水代替 DNA。

（3）运行标准 PCR 程序：94℃，5 min 进行最初变性步骤；接着进行 35 个 3 步骤的循环：①94℃变性 30 s；②在最佳退火温度引物退火 30 s；③72℃延伸 45 s。

（4）在含有 1 μg/mL 溴化乙锭的 1×TAE 缓冲液中，在 2%琼脂糖凝胶上电泳 PCR 产物以控制 PCR 产量。每孔中加入 10 μL PCR 产物（5 μL PCR 产物和 5 μL 2×上样染色液），并向一个孔中加入 10 μL 标准大小 DNA 梯以确保 PCR 产物长度正确。在 100 mA 的电流下进行电泳直至二甲苯蓝染色距凝胶底部约 2 cm。将胶置于 UV 透射仪下使 PCR 产物可见。

(5) 按说明使用 QIAquick 96 PCR 纯化试剂盒纯化产物（**注释 9**）。

(6) 准备 100 次反应所需的 Master Mix，含有：400 μL Big Dye 终止子混合物（**注释 4**）和 100 μL 1.6 pmol/mL 测序引物。

(7) 将 5 μL 每种 PCR 产物放入无边缘 0.2 mL 96 孔 PCR 板的每孔中，并加入 5 μL Master Mix。设置一组阴性对照，用 5 μL 水代替 DNA。

(8) 运行标准 PCR 程序：96℃ 10 s，50℃ 5 s，60℃ 4 min，进行 35 个循环，接着置于 4℃。

(9) 向每个样品中加入冰冷的 70%的乙醇并混合，以纯化反应产物。

(10) 室温沉淀 15 min。

(11) 4000 r/min 离心平板 30 min。

(12) 弃去乙醇，干燥沉淀（**注释 10**），盖上平板，−20℃保存待用，或加入 10 μL 甲酰胺上样缓冲液，立即进行测序。

(13) 使用 DNA 比对软件比对序列并确定 SNP。

4. 基因型检测

1) PCR 扩增

(1) 准备 100 个反应所需的 PCR Master Mix。一个 50 μL PCR 反应需要如下试剂：1 × PCR 缓冲液，0.2 mmol/L 每种 dNTP，1.5 ~ 3.0 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L下游和上游引物（**注释 11**），1 U AmpliTaqGold 聚合酶。生物素化正向或反向引物（**注释 5 和 6**）。

(2) 将 5 μL 每种 DNA（250 ng）放入 0.2 mL 96 孔 PCR 板的每个孔中，并向每孔中加入 45 μL master 混合物。设置一组阴性对照，用 5 μL 水代替 DNA。

(3) PCR 反应：首先 95℃变性 5 min，接着进行 50 个热循环，每个循环包括 95℃变性 15 s，适当温度退火 30 s，72℃最终延长 15~30 s。

(4) 在 2%琼脂糖凝胶上检查 PCR 产物的大小和量（**注释 12**）。

(5) 盖上平板，−20℃保存待用。

2) 准备样品

(1) 向 50 μL PCR 产物中加入 50 μL 结合缓冲液，在链霉抗生素蛋白包被的琼脂糖 HP 微珠上固定生物素化的 PCR 产物。

(2) 加入 4 μL 链霉抗生素蛋白包被的琼脂糖微珠，室温在 Thermomixer R 上 1400 r/min混合 10min。

(3) 将链霉抗生素蛋白包被的琼脂糖微珠和 PCR 混合物转移至 96 孔过滤板中，真空过滤除去多余液体。

(4) 在 50 μL 变性液中变性与链霉抗生素蛋白包被的琼脂糖微珠相连的生物素化的 DNA 1 min，除去非生物素化的 DNA 链。

(5) 真空除去变性缓冲液，用 150 μL 洗涤缓冲液洗涤 DNA 2 次。

（6）在 50 μL 退火缓冲液中重悬 DNA。

3）Pyrosequencing 反应

（1）混合 DNA 孔，转移 40 μL 至 96 孔 PSQ96 板中。

（2）将适当的测序引物加入 5 μL 的 3 μmol/L 储备液中，因此反应体积为 45 μL。

（3）在电热板上 80℃退火测序引物 2 min。

（4）室温冷却样品 5 min，使引物更好地连在模板上。

（5）样品冷却后，将板放在 Pyrosequencer 上，按说明中的顺序向 SQA 柱中加入 PSQ96 试剂。

（6）使用 Peak Height Determinatio 软件 v1.1 定量 Pyrosequencing 输出的数据。

5. 数据分析

（1）将果蝇生存时间记为羽化之日到登记死亡的前一天，以此来估计寿命。

（2）使用单向阶乘 ANOVA 分析品系平均值，评估分子多态性与寿命的联系，依照如下模型：

$$y=\mu+M+S+M\times S+E$$

其中，M 和 S 分别代表分子标志物和性别的固定作用。统计上显著的 M 表示分子标志物与寿命差异之间有关联。

22.4 注释

（1）缺陷和突变群体可以从两个主要的果蝇中心获得：Bloomington Stock Center（Bloomington，IN）和 the Szeged Drosophila Stock Center（Umea，Sweden）。缺陷断点由 Stock Center 和 FlyBase（FlyBase@flybase. bio. indiana. edu）提供。

（2）用来建立杂交的亲本雌果蝇数［22.3.1 节**步骤（1）**］就是我们在检测中所使用的数目。增加或减少雌果蝇的数目会增加一瓶中幼虫的密度，从而影响寿命（***15***）。重要的一点是，取出用来检测的个体所在的瓶中的幼虫密度应相当。

（3）每次实验中所用的重复个体数根据基因型之中和之间的差异数以及想要检测的基因型之间可检测到的最小寿命差异而不同。预实验的数据可以用来估计每次处理之中以及之间的预期差异，并使用功率计算确定用来检测给定幅度下寿命差别的样本大小（***16***）。

（4）在 Big Dye 终止子循环测序 Ready 反应混合物中，预先将染色终止子、三磷酸脱氧核苷、AmpliTaq DNA 聚合酶、氯化镁和缓冲液在一个管中混合待用。

（5）引物之一用生物素标记以固定在琼脂糖微珠上。另外的引物不做标记。游离的生物素可与生物素化的 PCR 产物竞争与链霉抗生素蛋白的结合，从而降低信号水平，因此建议使用 HPLC 或等效步骤纯化生物素化的引物。

（6）生物素化的 PCR 引物对储存尤其敏感。用储备液稀释引物并分装。－20℃，而非 4℃保存引物储备液和稀释引物的分装。

（7）Pyrosequencing 测序引物的设计与 PCR 引物遵循相同标准，除了这个引物的 T*a* 可以降低之外。大多数情况下，带有 T*a* 的引物在 50℃左右时效果良好。如果一个或两个多态性碱基与相邻碱基形成同聚体，则不易得出 SNP。因此，设计测序引物需考虑避免 3′端与多聚延伸重叠的情况。如果不能避免，可以接受 5 个以下的 C、G、T 或 3A 聚合物。

（8）由于试验规模所限，寿命测试可能需要在另外的时间地点进行。

（9）为了尽量减少聚合酶错误对序列差异的影响，建议对每个品系用不同的引物对建立若干个 50 μL PCR 反应，在使用 QIAquick 96 PCR 纯化试剂盒纯化之前将其混合。

（10）确保管中没有液体残余，否则将遗留未合并的终止子。

（11）选择 PCR 引物扩增 < 300 bp 的片段。PCR 引物应当：①长 18～25 bp；②5′端 GC 丰富，3′端 GC 较少；③不与自身或其他引物构成沉重的发夹环或二聚物。由于 Pyrosequencing 反应的精度取决于 PCR 产物的特异性，选择引物非常重要。因此，为了更加精确地选择每组引物，强烈建议使用一个能够自动匹配引物设计的软件包。

（12）确保 PCR 产物纯净，不含多余的引物、引物二聚体或其他非特异性产物。

参 考 文 献

1. Guarente, L. and Kenyon, C. (2000) Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* **408**, 255-262.
2. Finch, C. E. and Ruvkun, G. (2001) The genetics of aging. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 435-462.
3. Gems, D. and Partridge, L. (2001) Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr. Opin. Genet.* **Dev.** 11, 287-292.
4. Finch, C. E. and Tanzi, R. E. (1997) Genetics of aging. *Science* **278**, 407-411.
5. Mackay T. F. C. (2004) The genetic architecture of quantitative traits: lessons from *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 253-257.
6. Long, A. D., Mullaney, S. L., Mackay, T. F. C., and Langley, C. H. (1996) Genetic interactions between naturally occurring alleles at quantitative trait loci and mutant alleles at candidate loci affecting bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1497-1510.
7. Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., et al. (2004) Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat. Genet.* **36**, 288-292.
8. Blenau, W. and Baumann, A. (2001) Molecular and pharmacological properties of insect bioamine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch. Insect. Biochem. Phys.* **48**, 13-38.
9. De Luca, M., Roshina, N. V., Geiger-Thornsberry, G. L, Lyman, R. F., Pasyukova E. G., and Mackay, T. F. C. (2003) *Dopa decarboxylase* affects variation in *Drosophila* longevity. *Nat. Genet.* **34**, 429-433.
10. Lyman, R. F., Lawrence, F., Nuzhdin, S. V., and Mackay, T. F. C. (1996) Effects of single *P* element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**, 277-292.
11. Greenspan, R. J. (1997) A kinder, gentler genetic analysis of behavior: dissection gives way to modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 805-811.
12. Ronaghi, M., Uhlén, M., and Nyrén, P. (1998) Sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**, 363-365.
13. Stam, L. F. and Laurie, C. C. (1996) Molecular dissection of a major gene effect on a quantitative trait: the level of alcohol deydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1559-1564.

14. Pasyukova, E. G., Vieira C., and Mackay, T. F. C. (2000) Deficiency mapping of quantitative trait loci affecting longevity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **156**, 1129-1146.
15. Leips, J. and Mackay, T. F. (2000) Quantitative trait loci for life span in *Drosophila melanogaster*: interactions with genetic background and larval density. *Genetics* **155**, 1773-1788.
16. Zar, J. H. (ed.) (1999) *Biostatistical Analysis*, *4th edition*. Prentice Hall, NJ.

第23章 在老化系统中定位数量性状位点（QTL）

Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping in Aging Systems

Hui-chen Hsu，Lu Lu，Nengjun Yi，Grary Van Zant，
Robert W. Williams，John D. Mountz

摘要 理解衰老引起免疫应答下降的遗传学基础是一项重大的课题。免疫系统中最显著的年龄相关变化是胸腺退化。本章集中讨论使用C57BL/6 J×DBA/2 J（B×D）重组自交系（RI）小鼠定位调控衰老相关胸腺退化的基因位点。检测BSD RI品系中导致胸腺退化的大量数量性状位点（QTL），以提高检测复杂性状（如免疫应答随衰老下降）的可信度与精确度。更重要的是，经过发展，现有方法能更精确地定位这些QTL，并在某些情况下直接鉴定候选基因。免疫系统的发育很复杂，免疫应答，尤其是衰老相关的免疫系统变化中涉及的细胞数目庞大，多个遗传位点和基因对衰老相关免疫应答的变化造成影响。本章概述的定量遗传连锁方法用于定位和确认对衰老相关免疫系统变化有重大影响的数量性状位点。

关键词 遗传连锁；近交小鼠；QTL；胸腺退化；负指数曲线；WebQTL GeneNetwork网站

23.1 引言

对动物模型和百岁老人的研究表明，衰老是基因和环境复杂相互作用的结果。高等动物中普遍使用的定量衰老和免疫衰老的生物标志物是胸腺退化。70多年前，Boyd报道了胸腺萎缩（*1*）。胸腺退化会发生在正常的、无应激反应的、未被操纵的小鼠中，是衰老的结果。胸腺退化也符合Strehler提出的描述衰老相关变化的4个基本标准，包括：①还原功能下降；②渐进过程；③作为内在作用发生；④最重要的是很多物种共有的普遍现象（**2**）。我们观察到B×D重组自交（RI）小鼠品系中衰老相关的胸腺退化较慢，并在肿瘤模型和细胞毒T淋巴细胞（CTL）反应中表现出更好的抗性，因此研究胸腺退化的影响尤为重要，然而影响衰老相关胸腺退化的遗传因素尚不清楚。我们已经证明，数学建模和多性状定位方法非常适合用于胸腺退化过程（*3*）。本章中我们使用胸腺退化QTL定位研究并理解衰老系统。应当指出的是，本章的目的是介绍QTL分析中可用的工具和一些软件的基本用法，如果要充分了解啮齿类动物种群复杂的遗传连锁分析的本质，读者有必要参阅其他文献（*4*～*10*）以获得背景知识。本章中使用的大部分遗传术语在GeneNetwork网站的词汇表（www. genenetwork. org/glossary. html ＃L）中有详细解释。

遗传连锁研究的基本的假设是，通过精确测定个体或品系中具有遗传变异的关键数量性状，能够分析影响免疫衰老的遗传因素。理想的数量性状可以简单地测量，具有高度的可重现性，最能反映所研究的老化表型。确定这种数量性状的一种方法是首先界定关键起始事件和主要修改事件的级别，定义机制框架。为确定胸腺退化的原因，有必要准确并丰富地定义“退化”。因此选择 QTL 分析中使用的参数尤其重要，QTL 分析“大量小鼠的胸腺”也要求所用的分析方法允许筛选大量小鼠的胸腺。退化可以用经典的整体胸腺变化［重量、大小（体积）、胸腺细胞的总数］来定义。这些信息丰富且相对容易获得，符合退化过程的经典定义。然而，胸腺退化不以恒定的速率发生（***11～13***），而可以看作是一个负增长轨道或测量的一个有限集。使用基因相同的 RI 品系允许对基因型相同的个体在不同年龄重复测量，也就是说可以在每个 RI 品系中重复，得到的数量性状可以用来进行各种研究，包括复杂性状分析和 QTL 定位。

RI 小鼠品系尤其适合于本研究或类似的研究，其特征是需要在不同时间处死基因型相同的小鼠以评估所研究性状的年龄相关性。这些研究需要正确地分析一套不同品系的小鼠，每一品系在不同时间的基因型完全相同。可以通过与其他基因已定位的 RI 小鼠品系比较进行类似的分析。另一种方法使用异种交配（B6×D2）F_1 小鼠得到整个一组 F_2 小鼠，本章不加以讨论。这种方法的一个缺点是每只小鼠的基因必须不同，并且需要确定每只小鼠的基因型，因此不能在基因型确定的小鼠中在不同的时间跟踪胸腺退化。

根据我们对胸腺退化的遗传连锁分析的经验，研究可以通过多层面方法来完成，最好采取以下策略（**图 23.1**）。

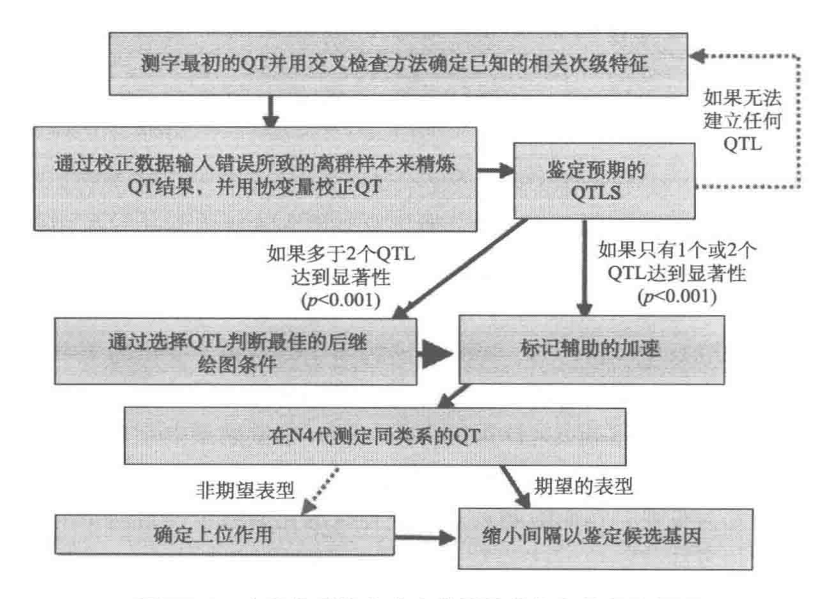


图 23.1 在老化系统中确定数量性状位点的方法概要

（1）确定感兴趣的表型，包括验证和功率分析，并确定衰老相关的胸腺退化表型变化。

（2）分析与确定表型相关的 QTL。

（3）确认胸腺退化表型上的位点的遗传效应。

本章描述理解胸腺退化的遗传基础的方法，同样的方法适用于任何在 RI 小鼠品系中可测量，并在所选的 RI 集中表现出遗传差异的数量性状。

23.2　材料

23.2.1　小鼠

C57BL/6×DBA/2（B×D）RI 小鼠品系的开发为本方法提供了基础，因为它：①能够实现对基因型相同而退化速率、寿命（***14***）以及骨髓原细胞更新率（***15***）显著不同的动物的胸腺重复取样；②能够确定胸腺中衰老相关变化的相对显著性。

杂交两个常用自交系（B6 和 D2）获得 B×D 重组自交小鼠品系，即（B6×D2）F_1 代品系，接着进行连续 20 代或更多的兄弟×姐妹交配，以获得不同 RI 小鼠品系。得到的 RI 集整个基因组的每个位点都是纯合的（对 B×D RI 集而言是 *b/b* 或 *d/d*）。由于 F_2 代中不连锁的位点随机混合，一个 RI 品系集中的亲本和重组等位基因组合的发生频率基本相同（**图 23.2**）。Benjamin A. Taylor 从 20 世纪 70 年代末期开始，繁育了 B×D 品系 1～32（***16***）。B×D33 到 42 同样由 Taylor 繁育，由 90 年代初开始的第二组杂交产生（***17***）。在 25 年中发现了很多品系的上百个有趣的性状表型，这个 RI 品系集是个非常好的资源。RI 品系的显著优点是两个亲本品系（B6 和 D2）都已经被广泛测序，并已知有大约 180 万个单核苷酸多态性（SNP）的不同。因此，结合 B×D RI 品系的基因分型数据和亲本 B6 和 D2 品系的遗传多态性数据，就能够确定 B×D RI 小鼠品系的整个基因组中多态性基因的衍生（**图 23.2**）。编码变体（主要为 SNP 和插入-删除突变）可能产生有趣的基因型，并能在这个特定的 RI 集中被迅速确认。每个位点有特定的遗传模式，称为品系分布模式（SDP）。就两个 SDP 而言，亲本表型的显著过量代表了遗传连锁的可能。

B×D 1～42 小鼠品系可以从 Jackson 实验室（Bar Harbor，Main）获得。为提高遗传连锁分析能力，Williams 和同事在 20 世纪 90 年代末到 21 世纪初使用改进的杂交后代产生 B×D43～B×D100（***18***）。这些品系也可以从 LL 和 RW 或 Oak Ridge National Laboratory 得到。

23.2.2　确定数量性状

数量性状是一个受基因影响的，或由基因和环境之间的相互作用影响的特征或情形。为了尽量减少观察导致性状变化引起的测量误差［类似量子力学中经典的海森堡测不准原理（***19***）］，理想的数量性状应当可以非侵入性地确定，如颜色或小鼠重量。也可以用非侵入性或最小侵入性分析，如在不同年龄进行免疫基因分型或血清分析，确定数量性状。然而，本章使用的数量性状需要处死小鼠。出于示范的目的，我们在分析中使用年龄相关的胸腺细胞计数下降作为主要数量性状。因此，最好有大量基因完全相同的小鼠，如使用 RI 小鼠品系。

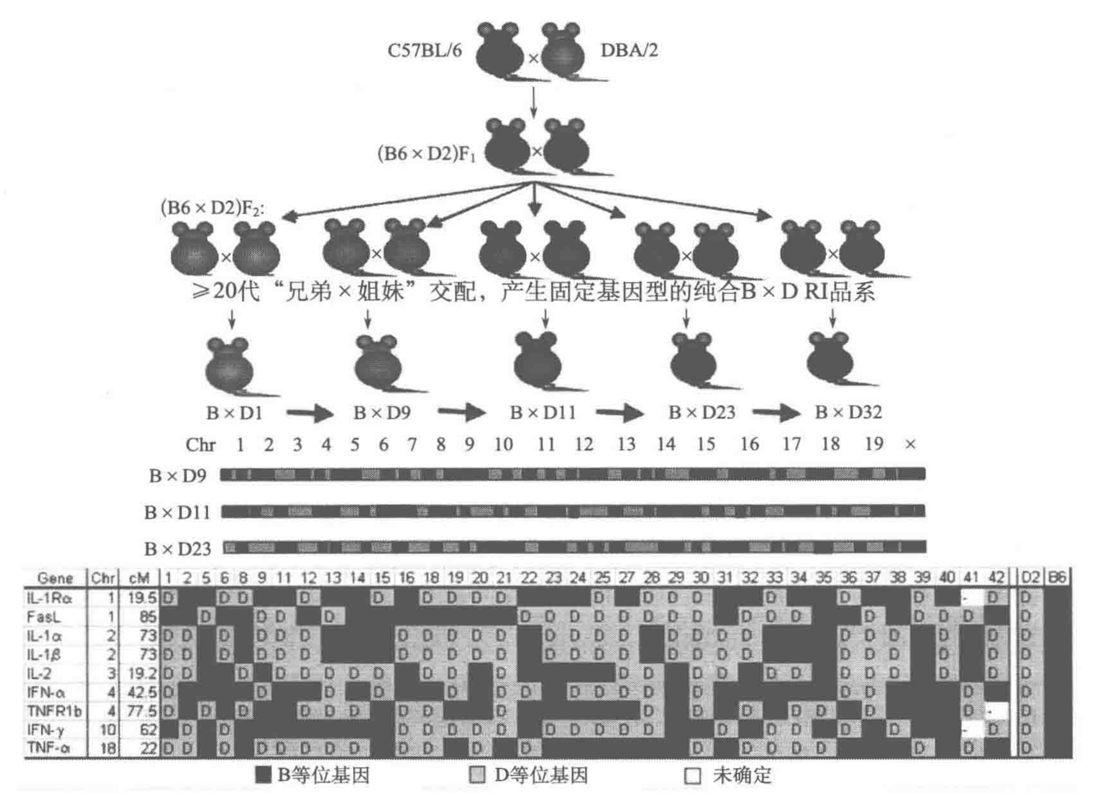


图 23.2　产生 B×D 重组自交（RI）小鼠品系。两个已有的自交组系（B6 和 DBA/2J）杂交产生 F_2 代，由 F_2 代开始系统地自交，得到 RI 品系。接着无须筛选即可产生多重独立品系。一旦自交，这样一个 RI 品系集可看作一个稳定的分离种群。在 Jackson Laboratory Mouse Genome Informatics 网站（www.jax.org）可以获得关于亲本 B6 和 DBA/2J 小鼠之间特定基因的多态性信息。这些信息可以用来在一组 B×D RI 小鼠品系中确定每个多态性基因的品系分布模式

数量性状应当是可遗传的，并需要在基因型相同的一组小鼠中表现出差异。数量性状显示遗传差异的指标之一是这个性状是否在亲本品系中不同。有趣的是，亲本品系中的性状差异并不是必需的，因为基因的分离可以增强或抑制所分析的性状，在 RI 集的个体之间的差异会大于亲本中观察到的差异。因此，即使亲本品系之间没有观察到数量性状的显著差异，在产生的 RI 品系中仍可以观察到数量性状的差异。这是因为由于基因组中其他位置 QTL 的阳性或阴性等位基因互补的作用，两个表型相同的菌株品系的 QTL 在遗传上仍然不同。

23.2.3　B×D RI 小鼠基因型数据库

用来进行遗传连锁分析的所有 B×D 品系（B×D1～B×D100）的基因型数据集可以从以下网站获得：

（1）GeneNetwork。将经过仔细的误差检查后的共有基因型建成 B×D 以及大部分

其他的遗传参照小鼠种群的 GeneNetwork。参见 http://www.genenetwork.org/mouseCross.html#BXD 中的概述，并可获得原始数据文件。

（2）SNP 定位表：小鼠 SNP 数据库由 Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research 维护，其中 C57BL/6J×DBA/2J 数据参见 http://www.broad.mit.edu/snp/mouse/HCCSortedMap68032700.html。

（3）可以获得 16 个品系小鼠的 Celera 和 Perlegen 序列的 SNP Browser 为 http://mouse.perlegen.com/mouse/。

23.2.4　遗传连锁分析

基因连锁分析可以用来确定基因组中含有观察到的数量性状的基因位置，从而确定 QTL。显著的 QTL 意味着在一个多态性标志位点的不同基因型与不同的特征值相关联。连锁由比值对数（LOD）或似然比统计（LRS）确定（**注释 1**）。参见多种计算所选的数量性状的 LOD 值或 LRS 值的程序以及详细深入的教程。

1. WebQTL

WebQTL（http://www.genenetwork.org/home.html）是 GeneNetwork 中用来定位数量性状的模块。它合并了若干个大型转录组和表型数据库，而且集合并整理了 25 年来发表的 6 组 RI 小鼠和大鼠品系（B×D，A×B/B×A，C×B，B×H，L×S，以及 H×B/B×H 重组自交系）的超过 1000 个经典的系统水平上表型的历史数据。最大的数据集是对 30～80 个小鼠品系的若干不同组织和细胞类型的转录组调查（Affymetrix 和 Agilent 平台）。每个 RI 表型数据集都带有仔细纠错过的用来定位修饰基因和数量性状位点（QTL，经常在表型和疾病易感性中造成变异）的遗传图谱。

2. Map Manager QTX

Map Manager QTL 是一个精心设计的直观界面（***20～22***），可从 http://mapmgr.roswellpark.org/mmQT.html 免费获得。Map Manager QTX 可用于 Macintosh 和 Windows 系统，是为数不多的几个只需要用户输入被分析小鼠的品系就可以计算遗传图谱的程序之一。为充分利用构建入 Map Manager QTX 的置换检验，需要将这一程序安装在带有快速处理器的电脑上。Map Manager QTX 程序以及内容丰富的教程和手册可以在 http://mcbio.med.buffalo.edu/mmrequest.html 下载并离线使用。另外还建议用户阅读 Tanksley 关于 QTL 定位策略及其局限性的综述（***23***）。

3. 其他有用的 QTL 定位软件

QTL Cartographer 是一个高效定位程序，特别适合有 UNIX 背景并喜欢高级统计分析的研究人员。该软件适用于 3 种操作系统，下载地址为 http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/cartographer.html。

在 http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm 的 Windows QTL Cartographer 是一个命令行式的、更加用户友好的 QTL Cartographer 版本。该程序包括一个更

有力的呈现定位结果的图形工具，能输入和输出多种格式的数据，并提供有 QTL Cartographer 特征的图形界面。Windows QTL Cartographer 分析能进行如下统计：单标志物分析，区间定位，复合区间定位，Bayesian 区间定位，多重区间定位，多重性状分析，以及分类性状分析。

在 http://web. bham. ac. uk/g. g. seaton/的 QTL Café 连接到一个 Java 小程序，能帮助用户进行在线 QTL 分析。用户需要 Netscape Navigator 4.05 或更高版本，并在启动前创建三个文件夹：一个包含标志物名称和位置信息的文件夹，一个包含基因型的文件夹，以及一个包含样本 ID 和性状值的文件夹。

MAPMAKER/QTL 是一个有用的程序，可以使用最大似然方法定位 QTL。该程序及教程可以在 http://www. genome. wi. mit. edu 基因组研究中心获得。

R/qtl（http://www. biostar. jhsph. edu/～kbroman/qtl/）由 Johns Hopkins 大学的 Karl W. Broman 开发（***24***）。当前版本的 R/qtl 能够通过区间定位（使用 EM 算法）、Haley-Knott 回归以及多重输入估计基因图谱、分辨基因型误差并进行单 QTL 和双 QTL 基因组扫描以及二维基因组扫描。这些都可以在协变量（如性别、年龄和处理方法）的存在下进行。另外，用 C 语言编码计算量大的算法，用 R 语言编码数据操作和图像功能，就能够通过该程序实现新的方法。R/qtl 支持多种格式的输入，并能在 Windows、Unix 和 Mac OS 下使用。

23.3 方法

23.3.1 胸腺的获得

小鼠的胸腺位于脊柱的中线，靠近心脏底部，包括两叶，一片光滑的薄膜覆盖在两叶上。两叶呈白色，具有一致的实质组织。通常情况下，3 个月的成年小鼠的胸腺平均重 30～40 mg（小鼠胸腺的解剖位置见 http://www. eulep. org/Necerropsy _ of _ the _ Mouse/imagesbig/Image18. jpg）。

(1) 在取出小鼠胸腺前，取一个装有 5～10 mL 冷无菌磷酸盐缓冲液（PBS）或 RPMI 1640 培养基的无菌塑料培养皿。

(2) 按照规定程序麻醉并杀死小鼠。

(3) 将鼠背部向下放于干净表面。用 70％乙醇擦拭腹部并彻底清洁上腹部两侧，防止毛发污染。

(4) 用一套无菌镊子和剪刀小心剪开毛发和皮肤。

(5) 用第二套无菌镊子和剪刀沿腹部中线剪开。

(6) 用同一套（第二套）剪刀剪开肋骨，露出胸腔。找出位于心脏前的，附在后胸壁的胸腺。

(7) 从较小一端夹起两叶，将其与胸壁分开，取出胸腺。剪下并丢弃多余的脂肪和结缔组织。

(8) 为包含次级表型，将每个胸腺称重并用数码相机（Nikon，Japan）拍照（**注释 2**），将两叶胸腺放入培养皿。

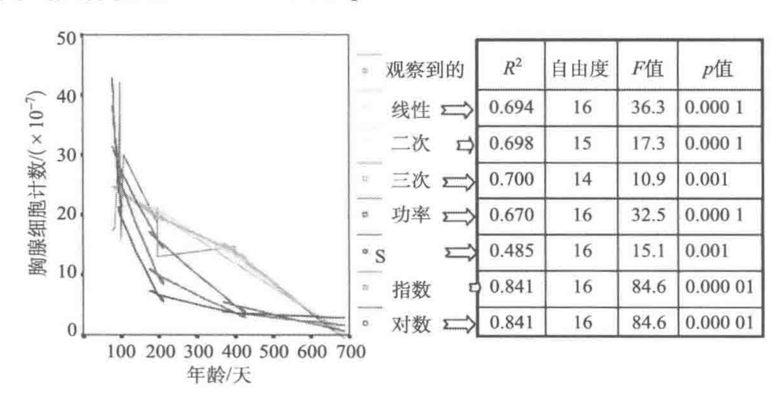
23.3.2　由胸腺制备单细胞悬液（**注释 3**）

按常规方法制备单细胞悬液，见 http://www.rit.edu/～gtfsbi/hytc/lymphocytes.htm。

23.3.3　测定亲本小鼠品系年龄相关的胸腺退化曲线

（1）为进行 QTL 分析，在多个个体上测量不同年龄小鼠的胸腺大小，或采集年龄相关的变化，生成胸腺退化曲线（**注释 4**）。用亲本小鼠品系（B6 和 D2）的胸腺细胞总数相对小鼠处死时年龄作图，生成胸腺退化曲线。

（2）使用 SPSS 统计软件包（version 11.0.1；SPSS Inc.，Chicago，IL）进行回归和统计分析。在线性、对数、逆、二次、三次、功率、S 曲线和指数曲线中选择拟合数据的方程，使得在所有品系中都能达到 Akaike's 信息标准（AIC）最佳值的函数形式，AIC 是一个著名的评价模型拟合相对于简约模型的拟合度的标准（*25*）（**图 23.3**）（**注释 5**）。我们的结果表明，将两个品系小鼠的胸腺退化速率拟合为负指数曲线最为合适，与其他回归曲线相比，负指数曲线表现出最高的相关性 R^2 值（**图 23.3**），并且可以用 $N(t)=\beta_0 * \exp(-\beta_1 t)$ 表示，其中 $N(t)$ 为胸腺细胞总数与年龄 t（以天计）的函数（*3*）。负指数曲线之前被描述为拟合人类（*12*）和 ICR 小鼠（*11*）胸腺退化以及其他生物变量（*26*，*27*）的衰老相关变化的最佳曲线。我们也应用此回归模型分析 Sempowski 等发表的数据（*28*），并发现，负指数曲线也是最好的 BALB/c 的总胸腺细胞计数对年龄的曲线拟合模型（$R^2=0.943$，$p=0.001$）。



观察到的	R^2	自由度	F值	p值
线性	0.694	16	36.3	0.000 1
二次	0.698	15	17.3	0.000 1
三次	0.700	14	10.9	0.001
功率	0.670	16	32.5	0.000 1
S	0.485	16	15.1	0.001
指数	0.841	16	84.6	0.000 01
对数	0.841	16	84.6	0.000 01

图 23.3　确定 B6 小鼠年龄相关的胸腺退化速率。由 B6 小鼠（$N=45$）胸腺制备单细胞悬液，使用血球计数板计数。将胸腺细胞总数对每只小鼠处死时的年龄作图，使用 SPSS 统计软件包的线性、对数、逆、二次、三次、功率、S 曲线和指数曲线拟合。分析表明负指数曲线对年龄相关胸腺退化的曲线拟合最好

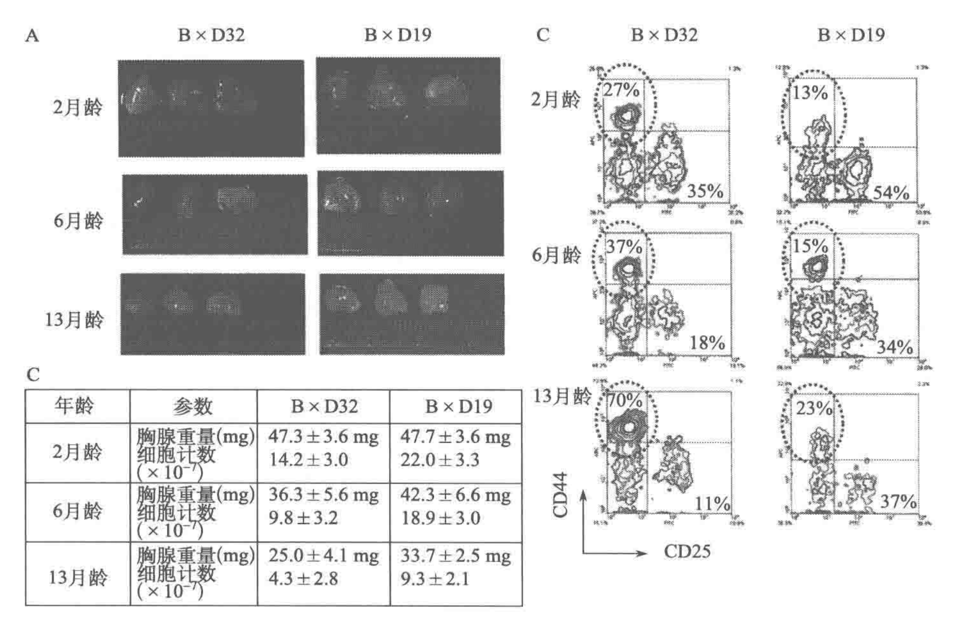
23.3.4　确定影响年龄相关胸腺退化的次级性状

（1）将以下次级表型：胸腺大小、胸腺总重、$CD44^+$ $CD25^-$ $CD4^-$ $CD8^-$ 双阴性（DN）胸腺细胞的积累，与初级性状数据比较（**图 23.4A～C**）。可以通过将每个品系在

每个年龄组的胸腺细胞计数相对次级表型作图进行比较。感兴趣的初级性状与次级参考性状相关度较低时，应对样品进行重复计数。

（2）需要进行更严格的胸腺表型分析以确保用来计数的单细胞悬液主要由胸腺细胞而非外周 T 细胞构成。例如，我们已经注意到，从老年自身免疫 B×D2 小鼠胸腺得到的单细胞悬液（*32*）中含有很大比例 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 单阳性 T 细胞和 $B220^+$ B 细胞。因此，QTL 分析中排除从 B×D2 小鼠得到的数据点。

（3）**副标题 23.3.3 步骤（2）**描述的测定胸腺退化斜率的过程可用于测定 B×D RI 品系小鼠每个品系的 $-\beta_1$ 值（**注释 5**）。



C

年龄	参数	B×D32	B×D19
2月龄	胸腺重量(mg) 细胞计数 (×10⁻⁷)	47.3±3.6 mg 14.2±3.0	47.7±3.6 mg 22.0±3.3
6月龄	胸腺重量(mg) 细胞计数 (×10⁻⁷)	36.3±5.6 mg 9.8±3.2	42.3±6.6 mg 18.9±3.0
13月龄	胸腺重量(mg) 细胞计数 (×10⁻⁷)	25.0±4.1 mg 4.3±2.8	33.7±2.5 mg 9.3±2.1

图 23.4　描述 B×D 小鼠年龄相关胸腺退化的初级和次级表型。为准确定量 B×D 重组自交（RI）小鼠品系的年龄相关胸腺退化速率，测量若干个代表胸腺随年龄变化的表型

（A）拍摄每个胸腺的照片；（B）对每只小鼠的胸腺称重；（C）使用流式细胞仪检测 $CD44^+CD25^+$ DN1 胸腺细胞前体细胞（圆圈区域中的细胞）所占的百分数。接着将这些性状与初级性状（即每只小鼠的胸腺细胞总数）比较，以尽量减少初级性状测量相关的误差

23.3.5　使用 WebQTL 进行遗传网络分析

以下部分描述了使用 WebQTL 以 $-\beta_1$ 值为 B×D RI 品系数量性状而进行遗传连锁分析的方法。

（1）进入 WebQTL 数据提交页面：http://www.genenetwork.org/cgi-bin/WebQTL.py。

（2）选择框中的 B×D，从菜单中选择杂交或重组自交组。

（3）向 WebQTL 数据页面的给定区域粘贴或输入数量性状数据。例如，已发表的 B×D 胸腺退化速率数据可以如下保存并粘贴：

x x 39.000 41.000 49.000 37.000 x x 35.000 132.000 30.000 45.000 50.000 x59.000 52.000 62.000 26.000 x x 52.000 x 65.000 x 36.000 52.000 34.000 x 66.000 56.000 x x x x x x x x x（**注释 6**）。

在向 WebQTL 输入框复制以上数据后，会生成一个 SDP，来计算 BXD 小鼠的 QTL 对年龄相关胸腺退化速率的影响。

（4）可以选择：启用性状差异和输入性状名称。

（5）点击“继续”进入性状数据和分析类型页面。

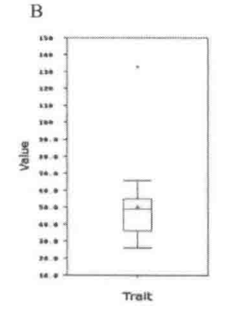
（6）为了在性状数据类型页面分析数据，选择适当的选项和一个或多个功能按钮（基本统计，性状相关性和成对检查）。会打开一个新窗口来显示结果，并向用户提供一系列额外的分析工具。

（a）基本统计（**图 23.5A～D**）提供了输入的数据组的品系信息、中值、平均值、标准差、最小值、最大值和范围。此外，基本统计页面包含一张图片，可以用来评价数据集是否正态分布（**图 23.5D**）。数据相对于理论正态分布绘制，各点应该近似组成一条直线。偏离直线说明偏离常态（**注释 7**）。

A

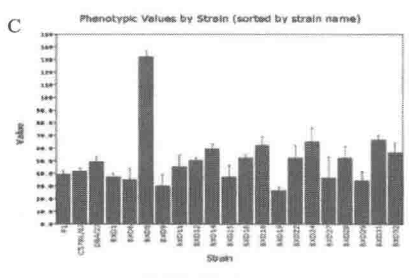
Strain	Value	Strain	Value
F1	39.0	C57BL/6J	41.0
DBA/2J	49.0	BXD1	37.0
BXD6	35.0	BXD8	132.0
BXD9	30.0	BXD11	45.0
BXD12	50.0	BXD14	59.0
BXD15	37.0	BXD16	52.0
BXD18	62.0	BXD19	26.0
BXD22	52.0	BXD24	65.0
BXD27	36.0	BXD28	52.0
BXD29	34.0	BXD31	66.0
BXD32	56.0		

B

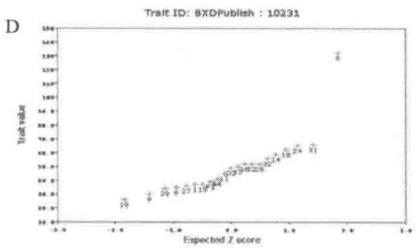


Informative Strains: 21
Median: 49.000
Mean: 50.238
Variance: 484.790
Std Deviation: 22.018
Minimum: BXD19 26.0
Maximum: BXD8 132.0
Range: 106.000

C



D



E

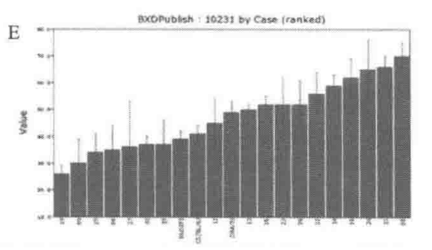


图 23.5　WebQTL GeneNetwork 网站提供的基本统计。WebQTL 的基本统计页面上以如下方式显示数量性状的品系分布方式（SDP）：（A）从每个 B×D 自交（RI）系获得的数量性状原始数据；（B）数据平均值和分布；（C）直方图显示各品系平均值和差异；（D）SDP的正态分布图；（E）截去从 132～70 的 B×D8 的异常值后，可以正态化年龄相关胸腺退化速率－β_1 值。截去异常值之后的数据更适于进行标准变量统计遗传连锁分析

(b) 性状相关性允许将输入的 B×D 性状值与数据库中的其他记录做比较，包括至少 500 种已发表的 B×D 表型，300 种 B×D 基因型，用 M430 或 U74Av2 基因芯片分析 B×D 大脑 mRNA 表达，用 M430 基因芯片分析 B×D 小脑 mRNA 表达，以及用 U74Av2 基因芯片分析 B×D 造血干细胞的 mRNA 表达。

例如，如**表 23.1** 所示前 6 个表型与 B×D 胸腺退化速率相关。有趣的是，相关性分析显示，年龄相关的胸腺退化速率与之前研究中的年龄相关的 B×D 性状值（老年 B×D 小鼠在注射 TS/A 乳腺肿瘤细胞系后的肿瘤易感性）显示出很强的负相关性（*37*）。这

表 23.1　与 B×D 重组自交小鼠品系年龄相关胸腺退化速率相关性最强的表型

	Record ID	Phenotype	Authors	Year	URL	Correlation	#Strains	p Value
1 ☐	**10231**	Age Related Thymic involution slope (-Beta1x10^4)	Hsu HC, Zhang HG, Li L, Yi N, Yang PA, Wu Q, Wu Y, Renda J, Xu X, Yang XW, Lu L, Van Zant G, Williams RW, Allison DB, Mountz JD	0	N/A	1.0000	21	0.00e+00
2 ☐	**10296**	Cocaine stereotypy-number of movements 15 mg/kg cocaine ip (difference from saline)-females	Jones BC, Tarantino LM, Rodriguez LA, Reed CL, McClearn GE, Plomin R, Erwin VG	1999	Pub Med	0.8554	15	9.88e-06
3 ☐	**10441**	Anti-F antigen (liver protein) titer, experiment 1 [log10 of the reciprocal of the dilution of serum required to bind 50% of the labeled antigen]	Oliveira DB, Nardi NB	1987	Pub Med	-0.9731	6	0.00020
4 ☐	**10161**	Catalase activity in brain [nMol]	Gill K, Liu Y, Deitrich RA	1996	Pub Med	-0.8800	9	0.00075
5 ☐	**10182**	Implanted breast tumor growth-tumor type [number of mice with tumor metastasis]	Grizzle WE, Mountz JD, Yang PA, Xu X, Sun S, Van Zant GE, Williams RW, Hsu HC, Zhang HG	2002	Pub Med	-0.7923	12	0.00123
6 ☐	**10311**	Cocaine activity-vertical rearing movements 30 mg/kg cocaine ip (difference from saline)-females	Jones BC, Tarantino LM, Rodriguez LA, Reed CL, McClearn	1999	Pub Med	0.6839	17	0.00175

两种性状的相关性可以从 WebQTL 网站获得，相关系数为－0.7923（**图 23.6A**）。这种分析提出了一个新的假说，即年龄相关的新胸腺产生能力的下降可能与 B×D RI 小鼠对 TS/A 的外周 CTL 应答降低有关。我们确实观察到这两种性状显示很强的负相关性（**图 23.6B**；$R^2 = 0.62$，$p = 0.0025$）。

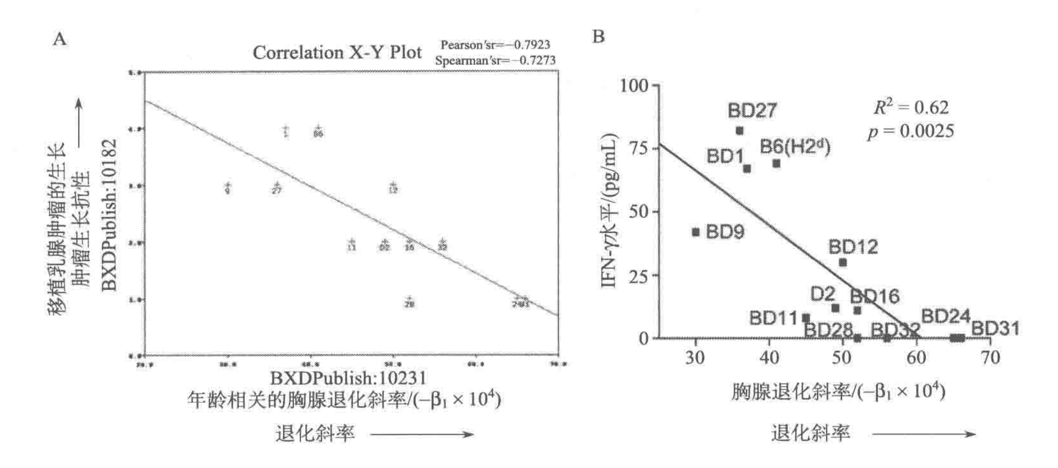
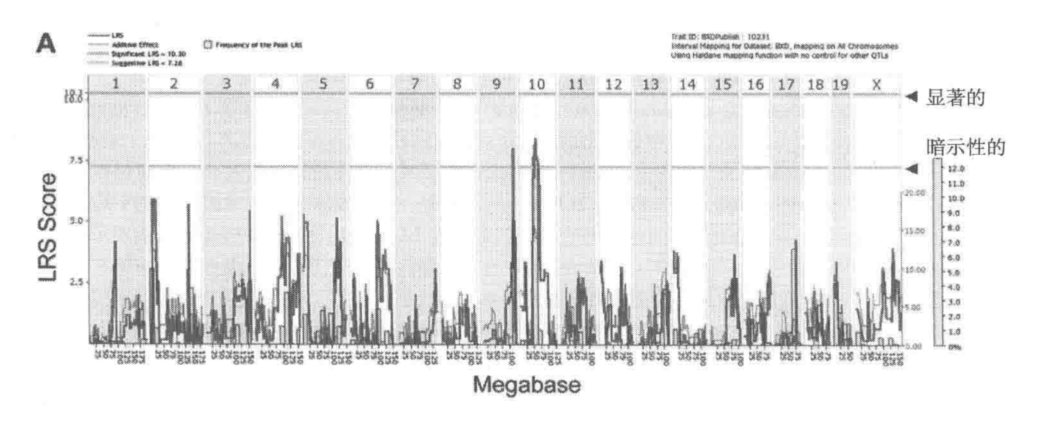


图 23.6　将输入的数量性状与 WebQTL GeneNetwork 中现有的 B×D Published Phenotype Database 相比较。这是 WebQTL GeneNetwork 提供的一个独特功能

（**A**）点击性状相关表上列出的相关系数值，可以得到乳腺肿瘤生长模式表型值对 B×D 重组自交（RI）小鼠年龄相关胸腺退化速率的散点图。如上所述，品系依赖的对 TS/A 乳腺肿瘤细胞移植的肿瘤发展抗性（*37*）与年龄相关胸腺退化速率（*3*）表现出强烈的负相关；（**B**）从所有移植了 TS/A 肿瘤细胞的 B×D 品系分离淋巴结 T 细胞，与已辐照的 TS/A 细胞（4×10^5 个）37℃共同孵育 5 天对其进行刺激。使用酶联免疫吸附测定确定干扰素 IFN-γ 诱导。用线性回归分析确定胸腺退化速率与 IFN-γ 水平的相关性。每个数据点代表从一个 B×D RI 或亲本品系得到的结果的平均值

（7）区间定位用来在相关的染色体上局部化 QTL。它计算整个基因组中的连锁图谱（**图 23.7A**），可以使用置换和引导检测来评估单一性状的连锁一致性（**图 23.7B**）（**注释 8**）。

（8）可以使用标志物回归对置换结果作图，列出与性状变异连锁的标志物，并有综合定位功能。接着在表格中显示出 B×D 数据集中与输入的性状数据相关的位点标志物



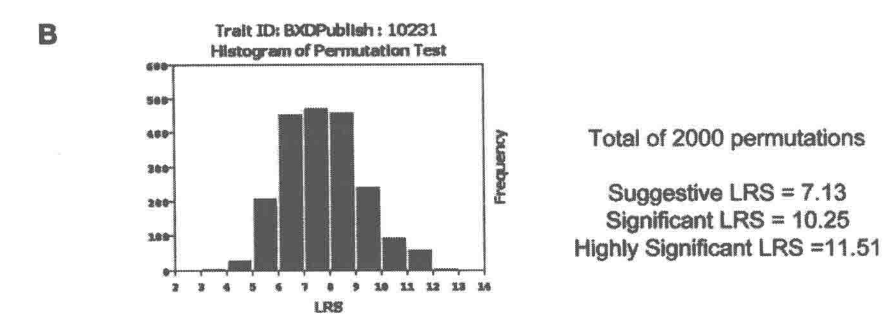


图 23.7 B×D重组自交小鼠品系年龄相关胸腺退化速率的数量性状位点（QTL）的全基因组扫描
（**A**）WebQTL 结果，显示包括 1～19 号和 X 染色体的小鼠全基因组。每个框顶部的数字即为染色体序号。对每个染色体的似然比统计（LRS）作图。细线是在试验间隔将单个 *b* 等位基因换成 *d* 等位基因的附加效应的估计。曲线表明，位于小鼠 9 和 10 号染色体上的 QTL 表现出最高的 LRS，因而对年龄相关胸腺退化速率影响最大；（**B**）WebQTL 提供置换检验的直方图，置换检验是通过暗示性的、显著的以及高度显著的 QTL 定位结果建立经验显著性阈值的方法（**注释 9**）（*54*）

A **Marker Regression Report**
The following loci in the BXD data set have associations with the above trait data.

LRS	Chromosome	Locus	Additive Effect
8.015	9	D9Mit20	15.338
8.103	9	D9Mit243	16.560
7.577	10	10.058.280	13.779
7.577	10	D10Msw061	13.779
7.577	10	D10Msw065	13.779
7.577	10	D10Mit61	13.779

2: UniSTS:131809

D9Mit243
Mus musculus chromosome 9
Found by e-PCR in sequences from Mus musculus.

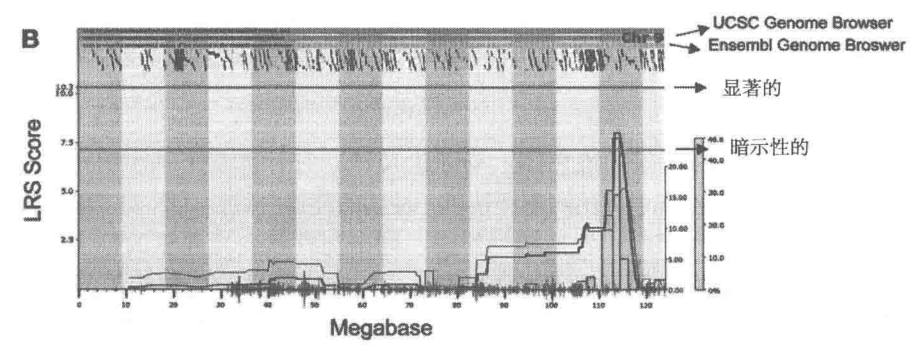
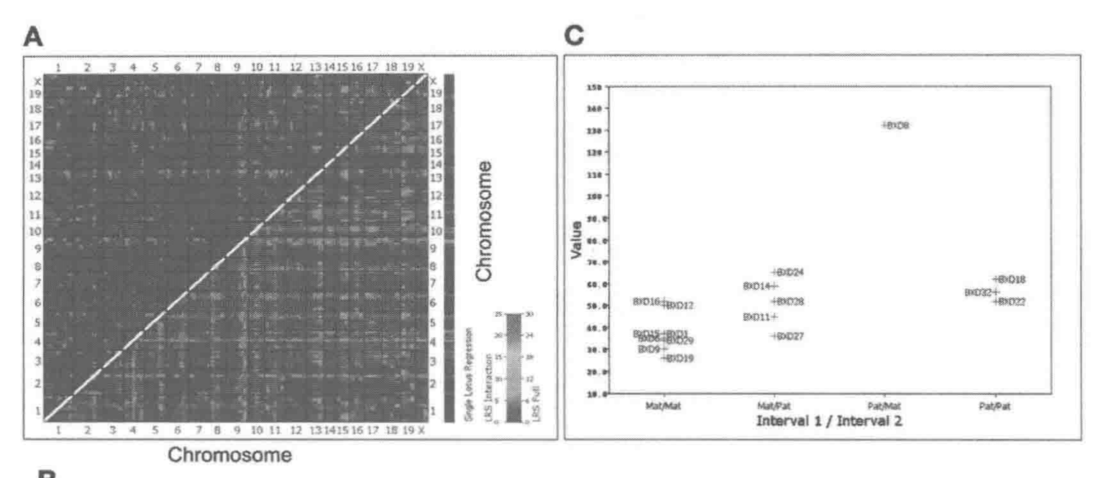


图 23.8 数量性状位点（QTL）标志物回归分析
（A）标志物回归报告（Marker Regression Report）提供了 B×D 数据集上显示与输入的 B×D RI 品系小鼠胸腺退化－β_1 值相关联的位点（Locus）。该报告列出的所有位点都显示比建议连锁值更大的 LRS 值。National Centers for Biotechnology Information（NCBI）UniSTS 数据库列出了各标志物的详细信息，可以通过点击每个标志物获得。这份报告给出的附加效应（Additive Effect）代表了这一标志物亲本等位基因纯合的平均表型，以及这一标志物和其他亲本等位基因纯合的差值的一半。例如，在 BDX 品系中，阳性附加效应表明 DBA/2J 等位基因增加性状值，而阴性附加效应表明 C57BL/6J 等位基因增加性状值；（B）LRS 曲线显示小鼠 9 号染色体 *D9Mit20* 和 *D9Mit243* 附近的胸腺退化速率的区间定位结果。粗线是 LRS 值，而细线是在试验间隔将单个 *b* 等位基因换成 *d* 等位基因的附加效应的估计。置换检验用来建立暗示性（suggestive）和显著（significant）连锁的标准，而可信度检验用来确定峰值 LRS（柱形）。在 California at Santa Cruz（UCSC）Genome Browser 和 the Ensembl Genome Broswer 网站可以查看相应的基因组片段

回归报告（**图 23.8A**）。选择定位的染色体（这里是 9 号染色体），评估初级性状相关的 QTL 连锁图谱，然后进行区间定位，在性状数据和分析表格页面上（**图 23.8B**）。

（9）双重扫描的特点能够分析分开的两个位点之间的上位相互作用。这种相互作用通过输入性状的双重扫描结果来显示（**图 23.9A**）。图的左半部分强调所有上位相互作用（对应标有“LRS Interact”一栏）。右下部分提供了整个模型 LRS 概况，代表线性和非线性项的累积效应（标有“LRS Full”一栏）（**注释 9**）。此页也显示了一张表格，列出前 50 个区间对的 LRS 值（区间 1 在左，区间 2 在右）（**图 23.9B**）。用“LRS Full”栏将区间对分类。用位于单独的最佳位置侧面的近端和远端标志物定义这两个区间。位于 LRS Full 栏的表格给出了相互作用形式（**图 23.9C**）。



B

Interval 1			LRS Full	LRS Additive	LRS Interact	LRS 1	LRS 2	Interval 2		
Position	Flanking Markers							Position	Flanking Markers	
	Proximal	Distal							Proximal	Distal
Chr 9 @ 66.6 cM	D9Mit243	D9Mit18	40.924 Plot	6.795	34.130	6.794	0.370	Chr 17 @ 44.5 cM	D17Mit159	D17Mit39
Chr 9 @ 66.6 cM	D9Mit243	D9Mit18	40.111 Plot	6.800	33.310	6.794	0.388	Chr 17 @ 43.7 cM	D17Mit159	D17Mit39

图 23.9　数量性状位点（QTL）的双扫描分析。双扫描是对两个标志物之间上位相互作用的分析（**A**）本图显示胸腺退化性状的双扫描结果。左上部分强调了任何上位相互作用（对应标有“LRS Interact”一栏）。与此相反，右下部分提供了整个模型的 LRS 的概况，表现了线性和非线性项的累积效应（标有“LRS Full”一栏）。WebQTL 对双位点上位互作用扫描基于 Ljungberg，Holmgren 和 Carlborg 开发的 DIRECT 全局最优算法（**55**）；（**B**）表格列出前 50 个区间对的 LRS 分数（区间 1 在左，区间 2 在右）。用“LRS Full”栏将区间对分类。用位于单个最佳位置侧面的近端和远端的标志物来定义这两种区间；（**C**）区间 1（*D9Mit243*～*D9Mit18*）与区间 2（*D17Mit159*～*D17Mit39*）的表型与基因型数据的比较。母本基因型是 B 而父本基因型是 D。本图说明 9 号染色体带有 D 等位基因的 B×D 品系 8 上位地增强 17 号染色体上 B 等位基因的能力，从而提高了 $-\beta_1$ 值

23.3.6　寻找位于已定位 QTL 附近的候选基因

这一节提供了一种寻找位于已定位的 QTL 附近的候选基因的方法。要强调的是，

寻找候选基因只为判断已定位的 QTL 区域是否包括能够影响目的数量性状的基因提供一种参考。这也可以作为将来确定已定位的 QTL 的详细基因克隆或遗传操纵研究的参考。但是，并不保证从网站获取的候选基因一定是影响所定位的性状的基因。

通过点击位于区间定位图顶部的对应基因组区域，直接访问位于 The UCSC Genome Browser 和 The Ensemble Genome Broswer website 上的已定位 QTL 附近的基因（**图 23.8B**）。此外，在 Jackson Laboratory（Bar Harbor，Maine）提供的 Mouse Genome Informatics 网站能够搜索候选基因。我们将再次以 9 号染色体上已定位的胸腺退化相关的 QTL（D9Mit243）作为示例。

（1）输入网址 http://www.informatics.jax.org/。

（2）在搜索菜单下选择基因和标志物。

（3）在 **Symbol/Name** 下键入 D9Mit243，在染色体下选择“9”，其他选项留空，点击“Search”。

（4）会显示 D9Mit243 在 9 号染色体（61 cM）的位置。

（5）回到基因和标志物页面。

（6）在“类型”下选择“基因”，在染色体下选 9，在 cM 位置选“50 和 70 cM”，其余留空，点击“Search”。

（7）将显示全部位于选择的染色体区域之间的基因。

（8）回到基因和标志物搜索页面。

（9）在“类型”下选“QTL”，在染色体下选“9”，在 cM 位置选“50 cM 和 70 cM”，其余留空，点击“Search”。

（10）将显示指定区域（9 号染色体上 50～70 cM ）中所有已报道的 QTL。这样，本页上，此次定位的位点显示为年龄相关胸腺退化 1（Arti1）。

23.3.7 从小鼠 QTL 到基因

亲本品系之间表现出多态性的基因在适当的细胞类型中表达，可能影响数量性状，更可能是候选基因。另一种帮助确定已定位的 QTL 附近的基因是否能够影响数量性状的方法是，使用基因工程小鼠确定改变候选基因的表达是否会改变表型（***38***）。然而，数量性状可能受 QTL 附近多个基因的综合影响（***39***），因此，单个基因的改变不足以提供候选基因和数量性状之间全面的联系，而且有些情况下，使用 QTL 分析方法甚至会出现假阳性结果。理想地，需要先使用额外的 B×D RI 品系，其他遗传背景的 RI 品系，重组自交杂交（RIX），或 F_2 代小鼠来确认定位的 QTL，再确认对感兴趣的数量性状有重要影响的基因。

在小鼠中，从 QTL 到基因的详细方法不在本章讨论范围之内。我们只讨论当前使用的一些可能的方法。

1. QTL 的精确定位

Mackay 概述了从 QTL 到基因的方法（***6***）。QTL 定位的两个重要的统计学考虑是功率和显著性的限制。在功率较低的情形下，不能够检测到所有的 QTL，导致结果的

重复性差，并过高估计检测到的 QTL 的影响。提高样本的数量能提高功率，也可以通过特定年龄遗传固定 B×D RI 品系表型的多重测量值的对数曲线来提高功率，并在能够提供最佳曲线拟合的年龄测定表型。我们的数据表明小鼠胸腺退化最接近负指数曲线。向每组加入更多的 B×D RI 小鼠能够克服高分辨率定位。Jeremy Peirce，Lee Silver 和 Robert Williams 已经生成并定位了额外的 40 种经过高级杂交的 B×D RI 品系，因此，与传统 B×D RI 集相比，有接近 2 倍的图距扩张（在 G10 小鼠中）（***18***）。为了复杂的性状分析，复合性状团体（Complex Trait Consortium）的成员们启动八向杂交，产生了 512 个用来进行复杂形状分析的 RI 品系（***10***，***40***）。这会提供更高的遗传多样性和亚-cM 定位分辨率。QTL 内的杂交品系能进一步用于更高精确度地定位和确认 QTL。

2. 使用同类系小鼠证实 QTL 分析

BXD RI 品系在连锁分析之后，可以产生同类系小鼠，分离不同背景下的感兴趣的遗传区域，以分析该区间的遗传学影响（***41***）。数量性状的位点/基因调控通常对观察到的表型有不同程度影响。影响表现型的非连锁基因之间不可预测的相互作用会妨碍对常规 F_2 杂交中观察到的数据的理解。因此，在最终克隆这种数量基因之前，一个重要的中间步骤是建立同类系小鼠，这样就可以独立研究每个数量位点作用。使用 B×D RI 系小鼠在 3.75 cM 内定位包含所需性状的遗传位点是可行的，因此通过分析靠近 DNA 标志物的不同感兴趣的位点——标志物辅助选择方法（MASP）——选择同类系的小鼠。这种技术使用 DNA 标志物筛选发生交换的回交后代，更迅速地缩短不同染色体片段（***42～46***）。产生交互同类系使研究人员能够确定：①D 背景上 B 等位基因的影响；②B 背景上 D 等位基因的影响；③定位的 QTL 与其他背景位点的相互作用。通过回交培育方法可以将 B×D RI 连锁分析确定位点转移到两个祖系中。F_1 小鼠可以与 C57BL/6J 或 DBA/2J 小鼠回交。确定每一代后代的基因型，携带感兴趣的等位基因的小鼠能进一步与相反基因型的祖系回交四代。

这个方法与 Lander 和 Schork（***47***）报道的在 3～4 个回交世代内培育标志物导向的同类系基本相同。基于基因分型结果，培育带有包含供体源材料的最少染色体的小鼠。如果符合条件的雄性不止一个，则计算消除的供体来源染色体的数量，只有染色体消除数量最大的雄鼠具有繁殖的资格。这种方法优于计算消除的供体来源染色体的长度，并选择染色体消除长度最大的小鼠，而不理会消除的供体来源染色体的数量。使用这一方法，每一代所需父本数量以及每一代所需标志物数量会在第四代（N4）内留下最少的供体来源材料。通过这种方法，第四代只留下 0.04%的供体来源材料，而保留的供体来源基因材料的平均染色体数为 0.78（**图 23.10**）（**注释 10**）。

23.4　注释

（1）LRS 为表型变异和特定遗传位点的遗传学差异之间的连锁提供了一种度量。将 LRS 值除以 4.61 转换为 LOD 分数（比值比对数）。LRS 值本身并不是连锁概率的精

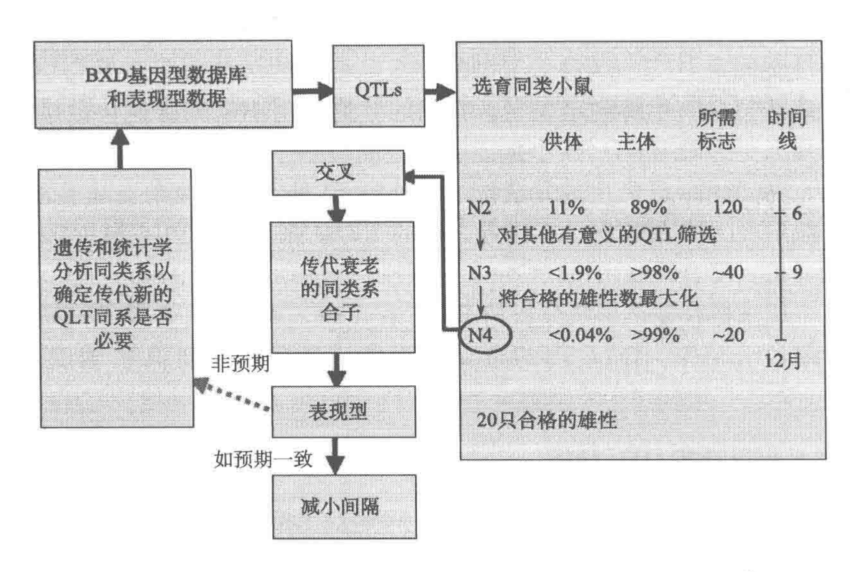


图 23.10 标志物辅助快速产生同类系小鼠概述。本图概述了由 Geiger 等（***41***，***56***）和其他人（**42**，**57**，**58**）描述的产生纯合同类系小鼠的方法

确度量，但是在 F_2 代杂交和 RI 品系中，超过 15 的值通常是值得注意的，应对其进行简单区间定位。LOD 比值提供了表型变异与特定遗传位点的遗传学差异之间的连锁的一种度量。LOD 与 $-\log(P)$ 大致相等，其中 P 是连锁概率（$P=0.001=>3$）。LOD 分数分析等价于似然比检验，但用以 10 为底的对数取代自然对数。连锁分析中，感兴趣参数是所比较的标志物和位点的重组分数（θ）。零假设代表 QTL 与标志物位点不发生连锁（$\theta=0.5$），而另一个假设假定连锁存在（$\theta<0.5$），LOD 分数函数定义为：

$$\text{LOD}(\theta)=\log_{10}[\text{like}(\theta)/\text{like}(\theta=1/2)]$$

（2）作为判断感兴趣的主要数量性状的精确性的另一种途径，次级表现型的测量也是重要的。

（3）制备胸腺细胞技术所用的单细胞悬液与 Bader（***48***）描述的基本一致。步骤见 http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/vol-18/6-bader.pdf。

（4）与胸腺退化的遗传学分析相关的一个难点是胸腺的初始大小，它会影响对胸腺退化速率的测定。这意味着，两个性状可能彼此独立，如果只是简单地比较年轻和衰老小鼠的胸腺细胞计数，初始大小也会混淆退化速率的测定。我们使用 B×D RI 品系小鼠的研究清楚地论证了这种观点，因为所有品系和亲本 B6 和 D2 品系有不同的初始胸腺细胞数量和胸腺退化速率，而初始胸腺细胞数量和衰老后的胸腺细胞数量并没有必然的相关性（***3***）。因此，为了显示胸腺退化是年龄相关的功能变化，我们应用一个数学模型来产生能最好地表现胸腺随时间变化的数量性状。此类方法已用于获得生长相关或其他年龄相关性状的 QTL（***49***，***50***）。

（5）Akaike's 信息标准（AIC）由 Akaike 在近 30 年前提出，是从一群竞争模型中确定最佳模型的信息标准（***25***，***51***）。数学上，$\text{AIC}=\ln(s_m^2)+2m/T$，其中 m 是模型

中的参数个数；s_m^2是［在一个 AR（m）的例子中］估计残差；s_m^2＝（模型 m 的方差之和）/T，即模型 m 的平均方差。

在模型的拟合（残差平方和最小）和模型的复杂性（由 m 度量）之间做出权衡，选择 m 使得准则最小。因此对一组给定的数据，可以通过这个标准比较 AR（m）模型和 AR（$m+1$）模型。

一个等价公式是 AIC＝T ln（RSS）＋2K，其中 K 是回归因子的数目；T 是观察次数；RSS 是残差平方和；调整 K 值，使 AIC 最小以而选择 K。

（6）每个 B×D RI 小鼠品系中用来描述数量性状的负指数曲线反映了成年前期到成年后期的胸腺退化。其他影响年轻小鼠或衰老小鼠胸腺大小的因素可能不遵循该曲线，不能用这特定的数量性状在 QTL 中表示。本章描述的 B×D 胸腺退化数量性状能够从 WebQTL 网站 B×D Phenotype Database 搜索得到。获得数据集的步骤如下：

（a）输入 GeneNetwork 网址 http://www.genenetwork.org/home.html。

（b）选择最适于特定查询的数据库。本例中我们集中研究小鼠 B×D 集。

（c）在“Choose Species”下选择“Mouse”，在“Group”下选择“B×D”，在“Type”下选择“Phenotypes”，在“Database”下选择“B×D Published Phenotypes”，在“Term”下输入“10231”，点击搜索按钮。

（d）在新页面，点击 **RecordID/10231 - Age-related thymic involution slope (-Beta 1 X 10^4) by *Hsu HC et al***。

（e）这会打开 B×D 年龄相关性胸腺退化的$-\beta_1$ 值数量性状页面的性状数据和分析表，随后使用由 GeneNetwork 提供的分析和定位工具进行遗传学连锁分析。

（7）当 SDP 不是正态分布时，该怎样处理数量性状数据集呢？许多 QTL 定位的统计学方法，如区间定位和混合区间定位的 EM 算法，都是根据表型正态这一假设开发的。于是，绝大多数性状分析的第一步一般是检查数据及其分布。选择“Basic Statistics: function toward the top of the GeneNetwork Trait Data and Analysis Form”来完成这一步。此步的目的是检查分布是否充分接近允许使用标准参数统计的正态分布。按 QTL 定位的标准程序，分析之前应将表型变换为尽量接近正态分布。一定范围内的变化不会改变原始数据的信息含量，这只会改变彼此之间的特征值的关系（***52***）。可以使用多种变换方法，Box-Cox 变换提供了一类相当普遍的达到正态的变换（***53***）。Box-Cox 变换为：

$$y_i^{(\rho)} = \begin{cases} (y_i^\rho - 1)/\rho, & \rho \neq 0 \\ \log(yi), & \rho = 0 \end{cases}$$

其中，y_i 是原始表型；ρ 是参数。Box 和 Cox（***53***）开发了一种寻找最佳拟合到正态的 ρ 的方法。该变换包含了原始数据（ρ=1）和特殊情况的对数变换（ρ=0）。搜寻和处理任何异常值也是重要的。就 Record 10231 来说，可以注意到 B×D8 是一个高度异常点。除非我们使用秩序统计量，它在某些类型的分析中会产生不成比例的巨大影响。它也会对定位产生巨大的影响，除非我们温莎式地截断 B×D8（“温莎式截断”，取自英国君主，温莎堡的亨利八世，他习惯于砍掉他讨厌的妻子们和大臣们的头）。我们截断

的目的是保留 B×D8 的数据，并保持参数步骤的优势。为此，我们把 B×D8 从 132 截短到 70。GeneNetwork 用户能够暂时任意修改性状数据页面的所有数值。当 B×D8 被截到 70 的时候，它仍然有最高值（**图 23.5E**），而这时可以使用数据组进行连锁分析。

(8) 置换检验直接来自 Churchill 和 Doerge 的工作（***54***），是一种确定由区间定位过程产生的似然比统计的显著性的方法。该检验中随机改变后代的性状值，以破坏性状值和标志物位点基因型的所有直接联系。对在基因组所有位置的变更数据拟合为回归模型，记录最大似然比统计。该过程重复成百上千次后，如果没有 QTL 与任何标志物位点连锁，就会给出一个最大似然比值期望的分布。

(9) WebQTL 对双位点上位相互作用扫描基于由 Ljungberg，Holmgren 和 Carlbor 开发的 DIRECT 全局优化算法（***55***）。该方法的更多细节信息见 Dr. Ljungberg's 的网站 http://user.it.uu.se/～kl/qtl_software.html。一般来说，除非数据组非常巨大，超过 50 种情况或品系，才需要用该方法。

(10) 值得指出的是，分别在 B6 背景或 D2 背景上简单移动 D 型或 B 型 QTL，并不必然在同类系小鼠中得到期望的表型。一种观点是，对每种性状来说，有其他的 QTL 对表型造成影响。例如，B6 背景（B6 来源）中这些 QTL 的互补作用可能会改变同类系中 D2 产生的 QTL 的总体表达，而我们无法预测它们是否会增加或减少纯系的 B6 和 DBA 小鼠之间观察到的差异。产生互为补足的同系和检验模型让我们能够判断 QTL 区域是否会影响感兴趣的年龄相关变化，以及背景基因型中是否存在与该 QTL 的相互作用，从而降低在同类系小鼠中观察到无作用 QTL 的可能性。

致谢

本工作由 National Institutes of Health (NIH) R01 AG 16653 号拨款和 Birmingham VAMC Merit Review Grant 支持。Hui-Chen Hsu 是 Arthritis Foundation Investigator Award 获得者。WebQTL GeneNetwork 网站由一个 National Institute of Mental Health (NIMH)、National Institute on Drug Abuse (NIDA) 联合提供资金的 Human Brain Project、The National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) Integrative Neuroscience Initiative on Alcoholism (U01AA13499，U24AA13513) 以及 The National Cancer Institute (NCI) Mouse Models of Human Cancers Consortium (MMHCC) (U01CA105417) 资助。页面由 Jingtao Wang，Elissa Chesler 和 Kenneth Manly 维护。感谢 Carol Humber 女士出色的编辑工作。

参考文献

1. Boyd，E. (1932) *Am. J. Dis. Child.* **43**，1162-1214.
2. Strehler，B. L. (1968) *Gerontologist* **8**，14-16.
3. Hsu，H. C.，Zhang，H. G.，Li，L.，et al. (2003) *Genes Immun.* **4**，402-410.
4. Silver，L. M. (1995) *Mouse Genetics: Concepts and Application*. Oxford University Press，Oxford.
5. Belknap，J. K.，Mitchell，S. R.，O' Toole，L. A.，Helms，M. L.，and Crabbe，J. C. (1996) Behav. *Genet.* **26**，149-160.
6. Mackay，T. F. (2001) *Annu. Rev. Genet.* **35**，303-339.

7. Williams, R. W., Gu, J., Qi, S., and Lu, L. (2001) *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0046.
8. Abiola, O., Angel, J. M., Avner, P., et al. (2003) *Nat. Rev. Genet.* **4**, 911-916.
9. Belknap, J. K., Hitzemann, R., Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Buck, K. J., and Williams, R. W. (2001) *Behav. Genet.* **31**, 5-15.
10. Churchill, G. A., Airey, D. C., Allayee, H., et al.. (2004) *Nat. Genet.* **36**, 1133-1137.
11. Bar-Dayan, Y., Afek, A., Goldberg, I., and Kopolovic, J. (1999) *Tissue Cell* **31**, 391-396.
12. Steinmann, G. G., Klaus, B., and Muller-Hermelink, H. K. (1985) *Scand. J. Immunol.* **22**, 563-575.
13. Tosi, P., Kraft, R., Luzi, P., et al. (1982) *Clin. Exp. Immunol.* **47**, 497-504.
14. Gelman, R., Watson, A., Bronson, R., and Yunis, E. (1988) *Genetics* **118**, 693-704.
15. De Haan, G. and Van Zant, G. (1999) *FASEB J.* **13**, 707-713.
16. Morse, H. C., 3rd, Chused, T. M., Hartley, J. W., Mathieson, B. J., Sharrow, S. O., and Taylor, B. A. (1979) *J. Exp. Med.* **149**, 1183-1196.
17. Taylor, B. A., Wnek, C., Kotlus, B. S., Roemer, N., MacTaggart, T., and Phillips, S. J. (1999) *Mamm. Genome* **10**, 335-348.
18. Peirce, J. L., Lu, L., Gu, J., Silver, L. M., and Williams, R. W. (2004) *BMC Genet.* **5**, 7.
19. Heisenberg, W. (1930) *The Physical Principles of the Quantum Theory*. Dover, New York.
20. Manly, K. F. (1993) *Mamm. Genome* **4**, 303-313.
21. Manly, K. F., Cudmore, R. H., Jr., and Meer, J. M. (2001) *Mamm. Genome* **12**, 930-932.
22. Manly, K. F. and Olson, J. M. (1999) *Mamm. Genome* **10**, 327-334.
23. Tanksley, S. D. (1993) *Annu. Rev. Genet.* **27**, 205-233.
24. Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003) *Bioinformatics* **19**, 889-890.
25. Akaike, H. (1974) *IEEE Trans. Autom. Control* **AC-19**, 716-723.
26. Luft, A. R., Skalej, M., Schulz, J. B., et al. (1999) *Cereb. Cortex* **9**, 712-721.
27. Rogers, A., Hannon, R. A., and Eastell, R. (2000) *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1398-1404.
28. Sempowski, G. D., Gooding, M. E., Liao, H. X., Le, P. T., and Haynes, B. F. (2002) *Mol. Immunol.* **38**, 841-848.
29. Thoman, M. L. (1997) *Cell Immunol.* **178**, 117-123.
30. Hsu, H. C., Mountz, J. D., Williams, R. W., et al. (2001) *Mech. Ageing Dev.*, in press.
31. Li, L., Hsu, H. C., Grizzle, W. E., et al. (2003) *Scand. J. Immunol.* **57**, 410-422.
32. Mountz, J. D., Yang, P., Wu, Q., et al. (2005) *Scand. J. Immunol.* **61**, 128-138.
33. Chesler, E. J., Lu, L., Shou, S., et al. (2005) *Nat. Genet.* **37**, 233-242.
34. Chesler, E. J., Lu, L., Wang, J., Williams, R. W., and Manly, K. F. (2004) *Nat. Neurosci.* **7**, 485-486.
35. Chesler, E. J., Wang, J., Lu, L., Qu, Y., Manly, K. F., and Williams, R. W. (2003) *Neuroinformatics* **1**, 343-357.
36. Wang, J., Williams, R. W., and Manly, K. F. (2003) *Neuroinformatics* **1**, 299-308.
37. Grizzle, W. E., Mountz, J. D., Yang, P. A., et al. (2002) *Int. J. Cancer* **101**, 270-279.
38. Li, L., Hsu, H. C., Stockard, C. R., et al. (2004) *J. Immunol.* **172**, 2909-2916.
39. Chen, Y., Perry, D., Boackle, S. A., et al. (2005) *J. Immunol.* **175**, 1080-1089.
40. Threadgill, D. W., Hunter, K. W., and Williams, R. W. (2002) *Mamm. Genome* **13**, 175-178.
41. Geiger, H., Rennebeck, G., and Van Zant, G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5102-5107.
42. Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., et al. (1997) *Nat. Genet.* **17**, 280-284.
43. Wakeland, E., Morel, L., Achey, K., Yui, M., and Longmate, J. (1997) *Immunol. Today* **18**, 472-477.
44. Visscher, P. M. (1999) *Genet. Res.* **74**, 81-85.
45. Collins, S. C., Wallis, R. H., Wallace, K., Bihoreau, M. T., and Gauguier, D. (2003) *Mamm. Genome* **14**, 350-356.

46. Wong, G. T. (2002) *Neuropeptides* **36**, 230-236.
47. Lander, E. S. and Schork, N. J. (1994) *Science* **265**, 2037-2048.
48. Bader, J. M. (1996) in "Proceedings of the 18th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)" (Glase, J. C., Ed.), Vol. 18, pp. 113-123.
49. Jaffrezic, F. and Pletcher, S. D. (2000) *Genetics* **156**, 913-922.
50. Pletcher, S. D. and Geyer, C. J. (1999) *Genetics* **153**, 825-835.
51. Akaike, H. (1973) in "2nd International Symposium on Information Theory," pp. 267-281.
52. Lynch, M. and Walsh, B. (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sunderland, MA.
53. Box, G. E. P. and Cox, D. R. (1964) *J. R. Stat. Soc. B* **26**, 211-252.
54. Churchill, G. A. and Doerge, R. W. (1994) *Genetics* **138**, 963-971.
55. Ljungberg, K., Holmgren, S., and Carlborg, O. (2004) *Bioinformatics* **20**, 1887-1895.
56. Geiger, H., Szilvassy, S. J., Ragland, P., and Van Zant, G. (2004) *Exp. Hematol.* **32**, 60-67.
57. Moody, D. E., Pomp, D., Nielsen, M. K., and Van Vleck, L. D. (1999) *Genetics* **152**, 699-711.
58. Morel, L., Tian, X. H., Croker, B. P., and Wakeland, E. K. (1999) *Immunity* **11**, 131-139.

第24章 二维凝胶蛋白质组学：一种研究生物样本中衰老相关的蛋白质丰度或异构体复杂度差异的方法

2D Gel Proteomics：An Approach to Study Age-Related Differences in Protein Abundance or Isoform Complexity in Biological Samples

Helen Kim，Shannon Eliuk，Jessy Deshane，Sreelatha Meleth，Todd Sanderson，Anita Pinner，Gloria Robinson，Landon Wilson，Marion Kirk，Stephen Barnes

摘要 本章介绍了二维（2D）凝胶电泳的方法［结合等电聚焦（IEF）和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）］，凝胶的 Sypro Ruby 荧光染色，二维凝胶图像分析，使用基质辅助激光解析电离（MALDI）飞行时间（TOF）质谱（MS）进行肽质量指纹图谱（PMF）分析，液相色谱（LC）串联质谱（MS/MS），蛋白质印迹用于分析蛋白质氧化，以及使用质谱定位蛋白质氧化位点。许多方法被用于鉴定摄食葡萄籽提取物（GSE）后的大鼠脑中蛋白质所受影响——GSE 是一种用于增强抗氧化能力的食品添加剂。尽管已有关于 GSE 用于细胞或动物的慢性病模型的有益报道，其是否作用于某些具体蛋白质仍属未知。应用二维凝胶蛋白质组学技术能够在没有预知的情况下探明 GSE 作用的目标蛋白质。新的二维非变性（BN）电泳技术作为一种补充方法，可以先在非变性条件下分离蛋白质复合物（第一维），再变性分离这些复合物组分（第二维）。对于蛋白质氧化和蛋白质-蛋白质相互作用的分析与衰老相关的研究具有特殊的关联性，因为氧化应激和改变的蛋白质相互作用可能是衰老相关疾病的核心。由于生成数据库昂贵且耗时，本章最后阐述了与高通量技术的使用相关的质量控制问题，强调构建大型数据库时使偏差和随机人为技术误差最小化的重要性。

关键词 衰老；二维凝胶；电泳；神经保护；神经退行；葡萄籽；抗氧化；MALDI-TOF；LC-MS/MS；质谱；等电聚焦；oxyblot；品质控制；非变性胶

24.1 引言

二维凝胶电泳（2DE）技术的基础具有很长的历史（*1*），2DE 和质谱（MS）技术的新发展大幅地增进了蛋白质电泳在现代生物医学研究中的影响。特别地，市售塑料包装含不同范围固定 pH 梯度的低浓度丙烯酰胺（**2**，**3**）使得仔细的研究人员能够进行

等电点聚焦（IEF）。MS 的优势和计算机技术使得研究者能够将 MS 技术与多种蛋白质或肽段的分离结合起来，以实现高通量分析，以及鉴定生物样本中的多肽、蛋白质水解片段以及修饰产物。这些蛋白质组学的方法能帮助人们获得生物实验中前所未有的有关蛋白质表达和（或）修饰的信息。

我们使用 2DE 凝胶蛋白质组学来确定当饮食中添加 GSE 带来其宣称的健康益处时涉及的蛋白质，此种添加剂以其抗氧化活性作为卖点；起始的实验选用年轻的成年大鼠，以探明在成年早期使用这些食品添加剂是否会对衰老过程中的健康状况产生后续影响（***6***）。本章提及的大多数二维凝胶和蛋白质组学方法均取自该研究工作。由于蛋白质氧化对衰老相关的疾病至关重要，本章描述用于检测和定量生物样品中的蛋白质氧化水平的蛋白质印迹技术，以及用于鉴定涉及氧化过程的氨基酸残基的 MS 方法。最后描述了二维非变性电泳技术，该种技术实现了对于蛋白质复合物的分离，通过第一维非变性分离，和第二维变性电泳来分析复合物中组分（***7～9***）。本章重点关注 MS 分析之前的二维电泳蛋白质分离技术。此外，有综述（***10～12***）讨论了其他分离技术，如 MUDPIT（***13***），稳定的同位素标记方法，如 ICAT（***14***）和代谢标记（***15***），以及其他的质谱方法，包括由顶向下法（***16***）和傅里叶变换离子回旋共振质谱（***17***，***18***）。质谱技术产生的数据量很大，因此很少进行平行实验，这导致蛋白质的肽链质量和氨基酸序列的匹配未必正确；对于这些数据的详细检视需要熟识这些技术，而这些知识在生物学实验的研究人员中尚未普及。为强调合适的 MS 数据处理对于发表文章的重要性，本章结尾的注释总结了用于发表文章时，确定 MS 技术确定的蛋白质的重要指导由 Carr 等提供（***19***）。

如今有效的蛋白质组学技术产生了大量的数据，使得数据归档尤为重要。质量控制问题亦需被考虑：**注释 1** 讨论于质量控制问题与方法中各部分的关系。最后，由于蛋白质组学技术过于昂贵和耗时，而不同来源、技术、时间之间的偏差未被充分处理，**注释 2** 讨论偏差的来源。

24.2　材料

24.2.1　二维凝胶电泳所需化学试剂及来源

（1）离子交换树脂 IRN-150L（GE Healthcare）。

（2）DryStrip Cover Fluid（矿物油）（GE Healthcare）。

（3）Immobiline Drystrips，pH 3.0～10.0，11 cm，12 个包装（GE Healthcare）。

（4）Sypro Ruby 凝胶染料（液态，室温避光）（Molecular Probes）。

（5）乙酸（试剂级，室温）（Fisher）。

（6）两性电解质（100% 溶液，4℃）（GE Healthcare）。

（7）溴酚蓝（粉末，r. t.）（PlusOne）。

（8）CHAPS（粉末，－20℃）（Sigma-Aldrich）。

（9）胶状考马斯亮蓝凝胶染料（液态，4℃）（Pierce）。

（10）二硫苏糖醇（DTT）（粉末，－20℃）（Fisher）。

(11) 甘油（87% 液态，室温）(PlusOne)。
(12) 甘氨酸（粉末，室温）(Sigma-Aldrich)。
(13) 碘乙酰胺（粉末，−20℃）(Acros Organics)。
(14) 蛋白质检测试剂（液态，室温）(BioRad)。
(15) 十二烷基硫酸钠（SDS）（粉末，室温）(Fisher)。
(16) 三丁基膦（TBP）（液态，小瓶装，−20℃）(BioRad)。
(17) 硫脲（粉末，室温）(Sigma-Aldrich)。
(18) Tris-HCl（粉末，室温）(Sigma-Aldrich)。
(19) 尿素（粉末，室温）(GE Healthcare)。

24.2.2 仪器

(1) 聚乙烯螺纹口管，15 mL，50 mL (Fisher)。
(2) 玻璃 Dounce 匀浆器；2 mL，7 mL，10 mL (Fisher)。
(3) Ettan IPGphor Ⅱ 等点聚焦（IEF）单元（GE Healthcare）。
(4) Immobiline Drystrip Reswelling Tray (GE Healthcare)。
(5) IPGphor 陶瓷船 (GE Healthcare)。
(6) Optima TLA 100 桌面超速离心机 (Beckman)。
(7) TLA 100.2 固定角转子 (Beckman)。
(8) TLA 100.2 转子用厚壁聚碳酸酯管 (Beckman)。

24.2.3 储备液

1. 10% (*m/V*) SDS

(1) 向一个 100 mL 螺口管中加入预量的 100 mL 双蒸水，放入一根洁净搅拌棒。
(2) 标记弯液面凹陷处，然后倒出大约 1/3 体积的液体至另一洁净烧杯。
(3) 小心称量 10 g SDS，然后慢慢加入到装有水的螺口管中并搅拌。
(4) 此浓度的 SDS 必须加热至 37℃以上，以保证完全溶解。
(5) 完全溶解后，加水定容至 100 mL，再次搅拌以确保均匀。室温封口保存。

2. 10 mol/L 尿素

(1) 向 1 L 洁净的玻璃刻度量筒中添加大约 2/3 的 Milli-Q 水，搅拌。
(2) 称量 601 g 尿素至一称量船中，缓慢倾倒至量筒中，搅拌直至尿素开始溶解。
(3) 添加更多的水，搅拌直至尿素溶解，之后停止搅拌定容至 1 L。再次搅拌至均匀。
(4) 尿素完全溶解后，添加大约 10 g 离子交换树脂珠子并搅拌 1 h。这一过程除去体系内的离子和带电杂质。
(5) 最后，使用 0.22 μm 滤膜过滤，确保没有离子交换树脂珠子进入终瓶。室温封口保存尿素溶液。溶液的保存温度不要超过 30℃。

3. 1.5 mol/L Tris，pH 8.8

(1) 称量 90.8 g Tris 碱用于配制 0.5 L 溶液。

(2) 配制溶液前校准 pH 计；因为许多溶液的 pH 接近生理 pH（7.0～7.5），需要重新校准 pH 计的 pH 7.0 点和 pH 10.0 点。

(3) 标记一个 0.5 L 的烧杯，添加 0.5 L 水后用细线标出弯液面的下缘，并放入一只搅拌棒。之后倾倒出大约 1/3 的水。

(4) 一边搅拌一边缓慢加入 Tris 碱到烧杯中。待其完全溶解后测定 pH。读数应当在 pH 10.0～11.0 内。

(5) 保持搅拌，pH 计开启且电极放在溶液中，添加几滴浓缩的 HCl 至 Tris 溶液中，调整 pH 至 8.8。

(6) 一边搅拌将水定容至合适的体积刻度，之后搅拌至匀质，并滤菌至一个 0.5 L 的螺口瓶中，4℃保存。

4. IEF 裂解缓冲液

(1) 将**表 24.1** 中列出的成分混至水中，并搅拌定容至 50 mL，确保所有组分溶解。

(2) 使用 0.22 μm 滤膜滤菌至一灭菌的 50 mL 聚乙烯管中。

(3) 分装至 10 mL，标记日期后－20℃保存。

(4) 使用时，融化一管，1 mL 分装，在下次解冻前用尽。

(5) 使用前添加 TBP 和两性电解质（和 IPG 条相同的 pH 范围），得到 5 mmol/L TBP（200 mmol/L TBP 储备液 25 μL）和 0.5%（*V/V*）两性电解质（每 1 mL 裂解液中加 5 μL 的 100%储备液）。

表 24.1　等电聚焦裂解缓冲液

组分	期望浓度	储备液	配制 50 mL 储备液的用量
尿素	7 mol/L	10 mol/L	35 mL
硫脲	2 mol/L	粉末	7.61 g
CHAPS	4%	粉末	2.0 g
Tris-HCl	40 mmol/L	1.5 mol/L，pH 8.8	1.33 mL

5. IEF 重泡胀缓冲液

(1) 混合**表 24.2** 中的组分制备 IEF 重泡胀缓冲液。

(2) 添加水至 50 mL 定容体积，确保所有组分溶解。

(3) 使用 0.22 μm 滤膜过滤至 50 mL 聚乙烯管中。

(4) 分装至 10 mL，使用 15 mL 聚乙烯螺口管－20℃保存。

(5) 和 LB 一样，使用前添加 TBP 和两性电解质（和 IPG 条使用时相同的范围，如 4～7 或 3～10）。

表 24.2　等电聚焦重泡胀缓冲液

组分	期望浓度	储备液	配制 50 mL 储备液的用量
尿素	7 mol/L	10 mol/L	35 mL
硫脲	2 mol/L	粉末	7.61 g
CHAPS	4%	粉末	2.00 g
溴酚蓝	0.02%	10%（*m/V*）溶于水	100 mL
加水定容至所需体积			

6. 第二维平衡缓冲液

（1）混合**表 24.3** 中的组分至 IEF 溶液中。

（2）定容至 200 mL，确保所有干组分溶解。

（3）0.22 μm 滤膜过滤至 50 mL 聚乙烯管中；−20℃保存。

（4）对于还原平衡缓冲液（EqB）（65 mmol/L DTT）（DTT-EqB）：添加 0.1 g DTT 粉剂至 10 mL EqB。

（5）对于烷基化 EqB [2.5%碘乙酰胺（IAA-EqB）]：添加 0.250 g IAA 和 2 μL 10%溴苯酚蓝至 10 mL EqB。IAA 是光敏组分，配制和使用缓冲液时需避光（**注释 3** 关于烷基化化学的更多信息）。

表 24.3　用于 IPG 条的第二维平衡溶液

组分	期望浓度	储备液	配制 0.2 L 的用量
尿素	6 mol/L	10 mol/L	120 mL
甘油	30%	87% 储备液	46 mL
SDS	2%	粉末	4 g
Tris-HCl	50 mmol/L，pH 8.8	1.5 mol/L，pH 8.8	6.7 mL
加水定容至所需体积			

7. 10×SDS-PAGE 电泳缓冲液（1.92 mol/L 甘氨酸/250 mmol/L Tris，pH 8.3）

在一个洁净瓶中一次性配制 10 L 溶液，使用搅拌棒和套口并保持在室温。

（1）溶解 450.2 g 甘氨酸和 302.8 g Tris 碱在终体积 10 L 的双蒸水中，pH 即为 8.3，无须额外调整。

（2）然而，仍需要使用 pH 试纸检验一滴缓冲液以确认没有差错。

（3）注意：该 10×储备液不包含 SDS。我们只添加 SDS 至上层水槽，而不需要添加至下层缓冲液中。

24.3　方法

24.3.1　制备 IEF 样品

（1）样品选择：本章主要介绍如何使用蛋白质组学方法分析实验中的生物学样品，

并假定一个实验中的生物学样品包括对照和实验组之间的蛋白质差异，或者野生型和突变型细胞或动物体之间的差异。在我们以前发表的研究中，处死大鼠后，从颅骨中取出完整的脑，称重，迅速在液氮中冷冻，之后－80℃冻存备用（*6*）。类似的步骤适用于其他组织和器官。类似的方法也可以处理细胞沉淀，使用冷的磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗几次以去除细胞培养基。

(2) 浸入液氮中迅速冷冻组织或细胞沉淀。对于组织，首先用塑料称量船称取，之后使用锡箔包裹组织和称量船，使用－80℃抗冻的胶带预先标记，然后放入液氮中直至下沉。所有组织样品都以类似的方法处理后，放入－80℃冰箱冻存。

(3) 进行 IEF 实验时，从－80℃冰箱中取出一个脑组织，置于大塑料袋中，用锤子敲碎组织到合适的大小，或者充分解冻组织之后进行矢状切割，然后把剩余的部分放回－80℃冰箱中保存。分析影响整个脑的事件时，最好使用矢状切割。半个大鼠脑提供的组织足以用于进行二维电泳实验，因此剩下的半个可留做其他分析使用。重新对组织称重。为研究衰老相关的认知损伤，如记忆缺陷，应当研究大脑中海马区或额皮质等负责认知的区域。这些部分的切割最好使用刚从动物体内取出的脑组织，而不是－80℃冷冻保存的脑。

(4) 在 LB 中，使用玻璃匀浆器研磨组织（24.2.3 节中 7. 小节的配方），室温中保持组织与缓冲液的体积比或质量比为 1∶5，直到匀浆变得匀质（大约使用研磨棒研 5 次）。再重复 5 次。对于更难以处理的组织，如心脏或乳腺，需要使用玻璃-特氟龙电动匀浆系统，特别是对于复杂的样品。

(5) 匀浆在室温静置 30 min，然后使用研磨棒再次研磨匀浆，确保所有可能的聚集物都被打散。

(6) 使用 TLA100 超速离心机 100 000 *g* 离心 30 min。参数设置为 55 000 r/min，30 min，22℃，离心结束时制动。确保在非冷冻环境下离心，否则将导致尿素结晶，使蛋白质的溶解不均匀。

(7) 小心收集上清液并混合（如果多于一管），小心混匀，然后重新分装至小管中（100 μL），－80℃保存。

(8) 从每个合并样品中分出 10 μL 用于蛋白质浓度测定。我们的实验室使用 Bio Rad Bradford 试剂盒，其他品牌也可以满足需要。组织与缓冲液比例为 1 g∶5 mL 的脑组织在匀浆之后，蛋白质浓度通常为约 10 mg/mL。对于特定种类的样品，如果匀浆时加入近似等量的相同缓冲液，那么同一次实验中的样品应得到相似的蛋白质浓度。

24.3.2 第一维：等电聚焦

(1) 使用蛋白质分析信息，计算含 100 μg 蛋白质的每个样品体积。对于 11 cm 的 IPG 条，上样量通常为 150 μg，尽管 50 μg 已经足够用于样品分析。对于不能预分析的蛋白质样品，最佳上样量应经验性地通过对比不同浓度的上样来确定。如果样品为组织或整个细胞沉淀，并且怀疑目的蛋白质丰度较低，则至少需要上样500 μg。如果有足够的样品，建议首先尝试 3 个 IPG 条，上样量分别为 50 μg、100 μg、200 μg 或 500 μg。如果样品量不足以如此上样，使用最大的两个上样量，如 250 μg 和 500 μg，记录并作

为后续实验的参考。

(2) 使用额外的 LB 稀释样品至 110 μL，之后使用 RHB 1∶1 稀释至 220 μL，小心使用 200 μL 移液器上下吹吸混合样品。

(3) 小心吸取 200 μL 样品加入一个复水盘中的槽内，保持其在槽中央。

(4) 从 80℃冰箱拿出 IPG 条，胶面向下，逐一平放入合适的槽中，先放入一端，使样品（应当为蓝色）掩盖在条下且不会被挤出条带。依次拉起并重置条带的每一半以确保和样品最大程度的接触并赶走气泡。条带中不应当有不连续的样品，亦即条带下不能有不连续的蓝色；如果有，条带有可能“燃烧”，产生不当的 IEF 结果。如果发现条带中部有不连续的蓝色样品，使用移液器枪头转移部分槽内剩余样品至该处，然后使条带倒置。再拉起条带以确保蓝色连续充满整个条带。如果不连续仍然存在，取用更多样品并直接移液至受影响的条带长度下；尽管条带上准确的蛋白质上样量发生了改变，这仍比无法跑样从而得不到信息或者使之“燃烧”要好。

(5) 一个条带按照**步骤 (4)** 中完成后，在上面滴加矿物油以防止尿素结晶。

(6) 用剩余样品重复这一过程［**步骤 (3)～(5)**］直到矿物油覆盖所有条带。

(7) 盖住复水槽，让胶条在 22℃充水过夜（至少 12h）。

(8) 第二日早晨，从槽中取出条带，用水轻洗，然后置于 Ettan IPGphor IEF“船”中，小心将条带正极朝向船的正极。

(9) IEF 的芯需要用双蒸水润湿，但不要让水流下，然后放置于电极线中并保证对胶完全的电导能力。

(10) 按照**表 24.4** 中设定进行 IEF；这些是 Amersham Biosciences 为 11 cm 胶条推荐的基本方法。

(11) 为每条带设置最大电流 50 μA，温度为 20℃。

(12) 使用 IPGphor（Amersham）和其他 IEF 设备，设定运行参数。IEF 会自动停止。

(13) 完成后，从船中拿出胶条，将其设置接触滤纸以排出多余的矿物油。

(14) 分别将胶条保存在 15 mL 聚乙烯螺口管中，塑料面沿着管口使胶条滑入管中，防止碰到胶面。保持条带在管底部，将管竖直放入－80℃冰箱，并防止物理性扰动。

表 24.4　11 cm IPG 胶条的等电聚焦条件

阶段	电压/V	电流/mA	功率/W	时间/h
1 (step)	500	0.05	无设定	1
2 (gradient)	1000	0.05	无设定	1
3 (gradient)	6000	0.05	无设定	2
4 (step)	6000	0.05	无设定	2
Total				6

24.3.3　SDS-PAGE 的还原、烷基化及平衡

(1) 从冰箱中取出条带，置于一个平衡槽中；在另一槽中倒入新鲜配制的 DTT-EqB；在定轨摇床上轻轻摇晃 15 min，确保在相邻的槽间没有溢出。

(2) 转至另一盛有新鲜 DTT-EqB 的槽中，并再摇动 15 min。

(3) 最后，在新鲜配制的 IAA-EqB 中平衡 15 min，将每一条带上溶液大致排净，然后平放，使塑料面朝下室温放在一 Kimwipe 上，待所有条带都备齐。在 IAA-EqB 步骤中用锡箔纸包裹槽以让条带避光。在 IAA-EqB 平衡期间，可准备第二维电泳步骤。

24.3.4　第二维电泳（SDS-PAGE）

(1) 第二维电泳使用 Criterion™胶（Bio Rad）进行。10%的聚丙烯酰胺凝胶提供了对复杂蛋白质组很好的解析能力。一旦目的蛋白质通过首轮被鉴定出来，可改变聚丙烯酰胺浓度来进行第二维电泳以保证特定分子质量区域的最大分离。这些胶分装在一次性的塑料暗盒中备用。每一块上有一缓冲液槽，需要大约 50 mL 的 1×SDS 电泳缓冲液。塑料胶条和底部的胶确保了胶在运输和储存过程中密封于缓冲液中；在电泳上样前将它打开，以使胶底部和电泳缓冲液以及电流接触。

(2) 用 1×SDS 电泳缓冲液洗 Criterion 胶，然后在一水槽中控净大部分水分，之后将胶的一边点放在有 Whatman 滤纸的缓冲液槽中控干。

(3) 将标准胶竖直放入一个稳定的试管架中，然后将平衡后的 IPG 条带放在标准胶上，确保其贴近胶边缘的部分完全贴合，没有空气泡或是不连贯的地方。同时，确保条带位于胶上方；不要将其推入胶中，或是夹在胶和挡板之间，这会造成 2D 蛋白质点阵分布的扭曲。

(4) 条带放置好后，加 5 μL 预染的分子质量标准至孔道的一侧。这一部分是备选的：所有选用的样品自身都包含分子质量可测的蛋白质。如果重复跑同样样品的胶，那么没有必要添加分子质量标准。

(5) 槽底部应预先填充无 SDS 的 1×SDS 电泳缓冲液。有人愿意为了简单而在两槽中使用相同的含有 SDS 的缓冲液，我们则使用无 SDS 的 10×储备液，然后只添加 SDS（10 mL 每 2 L）至上槽中。这最大限度地减小在室温下 10×电泳缓冲储备液包含 SDS 的时间——因为加有 SDS 如果不尽快使用则会长菌。全部 12 块胶所需 1×电泳缓冲液体积约 5 L。

(6) 一旦下槽预充满电泳缓冲液，开始使用和槽一起的管道系统用水降温至 18℃。

(7) 放置 Criterion 胶至 Protean Ⅱ 12 的插槽内，并用 1×SDS-缓冲液（含 SDS）填满各上层电泳槽。检查以确保所有条带仍在原位，且所有上层槽都充有缓冲液。

(8) 电泳在 200 V 的恒定电压下进行，直到染料迁移到胶的底部，通常约需 1 h。

(9) SDS - PAGE 电泳后，凝胶可用于 Western 印迹，或固定用于染色（**注释 1，2 和 4～6** 关于实验设计和蛋白质电泳分析中的质量控制问题）。

24.3.5　二维凝胶的荧光 Sypro Ruby 染色

（1）佩戴预先用水和凝胶电泳缓冲液浸湿的手套，小心地打开胶盒并取出凝胶。只可以拿胶的底部。

（2）放入 Sypro Ruby 固定溶液（40%甲醇/10%乙酸）并轻轻在摇床摇动至少1 h；最好摇晃过夜。这一步是染色过程中最好的静置凝胶的时候。如有需要，可以放置过周末。

（3）固定后，弃去固定剂，并立即加入 Sypro Ruby 凝胶染色剂（从供货商提供的容器中取出后未稀释）。避光轻轻搅拌过夜，如有必要，用铝箔盖住整个摇床台面。

（4）第二天早上，弃去 Sypro Ruby 染色剂，将凝胶置于脱色溶液中（10%甲醇/10%乙酸）。仍需避光。

（5）1 h 后更换脱色溶液；之后每隔 1 h 更换 1 次脱色液，再更换 2 次。

（6）第 3 次脱色 1 h 后，获取凝胶的图像。

（7）完成凝胶染色、脱色和图像获取后，装在装有脱色液的密封袋中（避光）冻存。标记这些凝胶，这样，如果 6 个月之后在凝胶上挑点，将仍能够得到完整清晰的数据结果（**注释 7～10** 中对凝胶染色的额外讨论）。

24.3.6　二维凝胶图像采集

（1）使用 ProXpress 成像系统（PerkinElmer Corporation）获取 Sypro Ruby 染色凝胶的图像；这是系统以电荷耦合器件（CCD）相机为基础，记录各个长方形区域中的二维凝胶图像，然后使用数字化的“针”将图像连在一起。

（2）准备 ProXpress：洁净的 Kimwipe 用 70%的乙醇润湿，擦拭台面。

（3）喷一点水在台面上，湿润的台面可以“抓住”凝胶。

（4）确保凝胶上无可见的灰尘或微粒。

（5）拿起凝胶靠近底部两角的位置，放下时使凝胶顶部先接触台面。片刻后，可以“感觉”出防止凝胶撕裂的最佳放置位置。

（6）对于 Criterion 凝胶，可以同时扫描 3 块，2 块并排放，第 3 块放在它们下面。影像获取后可以旋转，但如果放置凝胶时考虑取像平台和与其他胶的位置，处理图像会更容易一些。

（7）对于 Sypro Ruby，激发波长和发射波长分别为 480 nm 和 620 nm。

（8）设置图像的分辨率为 100 μm。

（9）选择曝光时间，尽量利用成像系统的动态范围，即选择的曝光时间使得最高丰度的蛋白点的强度接近但不超过成像系统动态范围的 80%～85%。ProXpress 生成 16 位的图像，总像素为 65 536，使用优化后的曝光时间，最高丰度蛋白点的强度为 50 000～55 000 像素。

（10）获取图像后，把凝胶放回脱色液中，分析完成之前不要混淆不同的凝胶。

24.3.7　软件辅助图像分析

（1）对这个过程的一点说明是，关于如何实现二维凝胶软件辅助分析的详细说明将贯穿整个章节。没有必要一个人完成二维凝胶蛋白质组学的各个方面，这些不同的方面正逐渐由“机构”来完成，因此研究人员只需学习二维凝胶图像分析的“相关知识”，但实际上不用自己操作。这部分的目的是让读者理解二维凝胶图像分析的基本特点，但并非特定软件的详细操作培训。

（2）Progenesis Discovery™图像分析软件（NonLinear Dynamics，Ltd）具有一个“自动分析”向导工具，它允许用户建立实验，并使软件执行第一阶段的分析而无需用户干预。建立实验相对快速和容易。图像的自动分析可以在任何地方进行，时间从 1h 至过夜，取决于二维凝胶的数据集的大小和计算机系统的能力；默认程序在一天结束时开始自动分析，过夜处理。

（3）自动分析向导包含许多选项以优化分析。这些选项包括确定凝胶图像上感兴趣的区域（在凝胶图像内的矩形区域进行点检测），结合不同的过滤器能够决定样品点如何被检测（例如超过某一特定像素阈值的点），设置平均凝胶分组（用于生物或技术复制），并指定背景消减和正常化的方法。

（4）自动分析完成后，必须手动验证数据。这包括对凝胶图像内样品点的视觉检测，并可能包括“修复”点边缘和凝胶间的点匹配的错误。在这一阶段的分析中，需要处理诸如染色斑点、凝胶上部溶液中的气泡，以及被检作样品点的染料等图像伪影问题。一个基本的步骤是更正由胶间差异或样品差异造成的凝胶间错误匹配的样品点。作出这些更正后，软件重新计算背景并标准化。Progenesis 还实现了所谓“智能噪音校正算法（Intellegent Noise Correction Algorithm)”，简称 INCA，删除蛋白质样品点内或边缘的过饱和染色峰，如果该点的斜率更像是染料结晶，而不是被染色的样品点。染料晶体有一个非常陡峭的斜率，“峰顶”处较平；而样品点斜率较平缓，顶端为圆形。

（5）样品点检测的数据集包括样品数量、x 和 y 坐标、标准化后点容量，和 INCA 标准化容量，这些被输出至 Excel® 电子表格供进一步的统计分析。

（6）不管采取哪种软件来分析二维凝胶图像，目标可以归纳如下：

（a）检测尽可能多的样品点；

（b）确定在凝胶之间检测相同的样品点；

（c）确定不是在每一块胶上都有的点；所有的信息是有用的；

（d）从分析中删除非蛋白质物质，如染料结晶、灰尘、气泡等；

（e）确保分析生成的 Excel 格式文件可被下载用于统计分析。

24.3.8　用于鉴定重要样品点的统计分析，以及实验组之间的样品点辨析

（1）二维凝胶中包含有不同类别的信息，不同的研究人员将对他们的凝胶有不同的目标。但毫无疑问，对一组二维凝胶图像进行系统化和强大的数据分析，才能使得到的信息最大化。本节同上一节图像分析一样，不需要用户自己执行复杂的统计算法。本节

不详细说明如何执行每个统计算法，相反，我们理论地讨论不同种类的数据操作。用于二维凝胶蛋白质组学中高维度分析的强大的统计分析程序在不断发展，需要受过训练的统计人员从二维凝胶图像输入中提取全部信息。其他文献更详细地讨论算法和理论（***20***，***21***）。

（2）将数据转化成对称分布：统计分析能够确定观察到的不同组之间的凝胶样品点丰度或位置的差异是由于处理方式不同，还是随机出现的。为了测试一个蛋白质的平均强度在两组之间是否不同，可使用 t 检验。在检验之前，先观察所有的样品点强度的分布。如果分布为对称分布，即强度高于平均值的点与低于平均值的点的数量大致相等，t 检验是最可靠的方法。如果似真正的高强度样品点数量很少，而有大量低强度的样品点，最好对强度值进行对数转换，并使用转换后的数据（而不是原始强度）检测平均值的差别。

（3）t 检验是单变量检验，每次关注一个蛋白质。然而，大多数生物蛋白质并非相互独立，因此，这些蛋白质可能与不同的处理方式相互作用。考虑到这一生物特点，在统计检验中使用“多变量”测试，也就是说，测试能区分蛋白质组与组之间的差异，而不是单一蛋白质。t 检验或其他类似的单变量检验通常用于在多变量检验中降低蛋白质的数量。

（4）多变量检验可确定一组能够用凝胶加以区分的蛋白质。这些检验通常称为分类器。判别分析（discriminant analysis，DA）是一种分类器，测定从每组凝胶中心（平均）强度到选定的凝胶样品点强度间的距离。在同一个预先确定的阈值内的凝胶被分配到最相近的组中。对每个凝胶重复此步骤，直至所有的凝胶分在一组中。由于已知凝胶归属的真实的组，可以通过比对真阳性和假阳性结果来判定 DA 的质量。举个极端的例子，如果有一组蛋白质点出现在所有实验组凝胶中，而未出现在对照组，那么这些蛋白质点在对照组的总强度为零。该算法在胶的样品点序列中寻找这些样品点（通过图像分析软件预先确定的样品点数量）；如果发现凝胶上这些样品点的强度总和为零，则将它们归类为对照组胶。当样品点强度总和接近实验组胶的平均强度时，这一过程则相反。然而，如果有实验组胶上存在这些样品点，但强度非常低，且总和接近零，而非其他实验组胶中这些点在的平均值，那么该胶将被错误地分类为对照组。需要注意的是，实际总数量并不只是强度的总和，而是选定的蛋白质样品点的强度和它们之间相关性的函数。相关性的贡献使得 DA 成为真正的“多变量”分析。在我们研究葡萄籽对大鼠脑的影响时，DA 鉴定了 7 个凝胶样品点，它们在两个实验组间具有 100%的区分度（***6***）。换句话说，虽然确定了大量的强度在两个组间存在显著差异的样品点，但区分这 7 个样品点的则是它们的方差总和。

（5）主成分分析（principal components analysis，PCA）是一种可以图形显示一项实验中（如果有差别存在）组间差异的计算机技术。在传统的二维凝胶实验中，x 轴是蛋白质等电点或 pI 的度量，而 y 轴是蛋白质量的度量。两个坐标轴的平面即为二维凝胶。在一个主成分分布中，x 轴和 y 轴部分代表了凝胶样品点强度总和。然而，这些都不是简单的数值相加，而是凝胶样品点强度的组合；第一个组分是具有最大的方差的样品点强度的组合，而最后一个组分代表具有最小方差的组合。软件计算每个凝胶上这些

不同组合的数值，然后将凝胶在这些组分的定义的平面上进行分布。如果凝胶之间的差异与不同处理方式有关，即如果一组凝胶中的样品点强度与对照组有很大不同，则它们将在这些组分定义的平面上的不同区域形成聚集。PCA 可以在判别分析之前使用，看判别分析是否有可能很好地区分两个组；或者在判别分析之后使用，直观地展示 DA 中鉴定的两组蛋白质的区别［**注释 11** 论述二维凝胶数据分析的迭代性质，**注释 12** 论述差异凝胶电泳（difference gel electrophoresis，DIGE），可以替代单样品、单凝胶分析］，**注释 13** 论述平均蛋白质组学数据，**注释 17** 论述衰老研究中对蛋白质组学方法有影响的实验性问题。

24.3.9　自动凝胶样品点切割，即“采集”

（1）目标凝胶样品点（由图像和统计分析获得）使用自动化的 ProPic（Genomic Solutions）切割。Sypro Ruby 染色点的检验要求紫外线（UV）照射。大多数样品点采集器在 x 和 y 维度间由电子驱动，xy 平面由通过图像分析软件内生成的坐标点构成。样品点采集器按样品点编号的顺序选取样品点。**图 24.1** 示二维凝胶图像分析可以产生的信息类型。切割下来的部分在胰蛋白酶或其他蛋白酶孵育之前放入 96 孔板的孔内脱色。

（2）尽管 Progenesis 和 ProPic 可以通过排列目的蛋白质周围区域的“地标蛋白质”，在图像分析获得的图像排列凝胶，事实上这个选择并非使用 Criterion 凝胶的常规步骤，因为 Criterion 凝胶对有效的三角测量来说太小了，而且容许的误差范围过小。使用 Criterion 凝胶时，如果一次“挑拣”基于直接肉眼评估与，寻找之前分析的取点器中重新可视化的凝胶上的点对齐的那个点，则会引入较少误差。在这种模式下，点击需要采集的样品点。

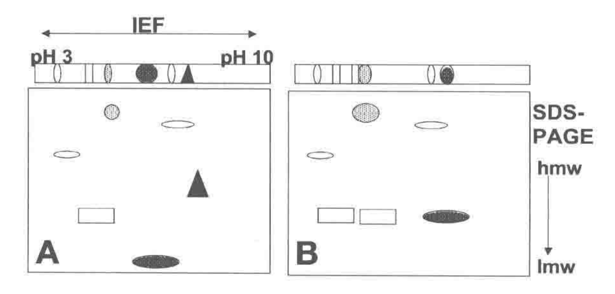


图 24.1　二维凝胶电泳分离多肽：可以得到的信息。本图显示了多肽依据在净电荷的差异的第一维度解析，以及基于表观分子质量差异的第二维（垂直维度）分离。右图显示一组蛋白质在响应刺激时可以检测出的差异类型：额外的矩形“点”代表一个发生了改变的多肽，因此等电点与原来的矩形不同，但很可能派生自后者，因为它们在第二维共迁移；较大的圆斑表示增大的丰度，这表明编码这个蛋白质的基因可能被上调，椭圆形点在水平维度上不同的位置，被检测为一个“新”点，但是当切割并进行质谱分析时，可以看作是原始椭圆点在未刺激细胞的凝胶中以不同分子质量迁移；这种差异表明，可能存在母肽段的异常剪切。最后，右侧凝胶中三角形的缺失表明，该基因可能被下调

24.3.10　凝胶内消化

这里描述的凝胶内消化和肽质量指纹图谱分析的实验方案基于加利福尼亚大学旧金山分校国家质谱资源中心提供的方法，参见 http://www.donatello.org，并经 Speicher 和他的小组成员改进（http://www.abrf.org）。

(1) 每个凝胶栓上覆盖 50 μL 的 Milli-Q 水，在旋转器中旋转 10 min，之后弃去水分。重复此步骤 1 次。

(2) 考马斯蓝染色和 Sypro Ruby 染色处理方法类似：在 100 μL 50%乙腈/50 mmol/L 碳酸氢铵中进行两轮 30 min 孵育。如果凝胶中仍有染料残留，则重复此步骤。

(3) 脱色的凝胶栓放在管中，置于 37℃培养箱中，直到管内检测不到水分。此时的凝胶栓不透明。

(4) 胰蛋白酶储备液（12.5 μg/mL）使用 25 mmol/L 碳酸氢铵 1∶1 稀释。将 10～20 μL 等分的胰蛋白酶稀释液加到每个干凝胶栓。等待 10～15 min 使凝胶重新膨胀，并吸收胰蛋白酶。再加入 25 mmol/L 碳酸氢铵覆盖凝胶块。37℃ 孵育过夜。

(5) 过夜孵育之后，加入 50 μL 5%（*V/V*）甲酸终止胰蛋白酶消化，然后水浴超声 30 min。转移上清液至一个新的 0.5 mL 离心管中。

(6) 为复原凝胶块中剩余的多肽，加入 50 μL 的 50%乙腈/ 5%甲酸，水浴超声 30 min。合并提取的溶液至新的离心管中，用 Speedvac 蒸发烘干至 10～20 μL，并通过 C_{18} ZipTips 脱盐。所得体积的 0.5 μL 用于基质辅助激光解吸/电离（MALDI）-飞行时间（TOF）质谱分析。剩余的样品可以用液相色谱法（LC）电离（ESI）串联质谱，通过序列分析确认 MALDI-TOF 质谱分析给出的蛋白质。

24.3.11　使用 MALDI-TOF 质谱进行肽质量指纹图谱分析

许多机构以共享核心设施的形式为研究人员提供 MS 分析，“操作员”对凝胶样品点中的多肽混合物进行的 MALDI-TOF 质谱分析，然后把数据交给研究人员。这种模式下进行分析的目的在于减少背景污染，因为操作员有保持环境清洁以及使用自动化设备的经验。尽管如此，一些研究员可能仍需亲自准备 MALDI - TOF 质谱样品。

(1) 含肽样本与“基底”饱和溶液混合于 50%乙腈水溶液（通常以 1∶1 混合，然后用基底溶液进一步稀释）。将混合样品（0.5～1 μL）点在 MALDI 目标板上（通常是不锈钢，有时镀金），并风干。板上通常标有编号的 10×10 点阵。需记录每个样品点位置。最常用的蛋白质水解肽的基底是 α-氰基- 4 -羟基酸。上样后，将板放入 MALDI-TOF 进行质谱分析。

(2) **图 24.2** 是一个“原始”的 MS 谱图，来自一个胰蛋白酶消化的凝胶样品点的 MALDI-TOF 分析 。每个峰代表消化生成的不同多肽片段。峰 A 是一个 *m/z*（质量/电荷）值为 2012.99 的肽，来自目的蛋白质的消化。峰 B 是一个来自胰蛋白酶水解的肽段。胰蛋白酶可切割其自身（也称自催化）。使用这些自消化峰校正质谱可以更精确地搜寻并确定蛋白质的分子质量。

(3) 为了成功地确定蛋白质，质谱必须通过去同位素过程简化。由于碳-13 的自然

丰度（约占所有碳原子的1%），**图24.2**中看到每个峰实际上是一系列同位素峰。碳-13同位素峰的丰度随着碳原子的增多而增加。就15个残基的多肽而言，碳原子数约100，碳-13同位素的强度峰值将接近或超过所有碳-12峰。**图24.3**示质谱中同位素分布的现象。这种情况下，包含碳-13的 m/z 1367.82峰的强度是 m/z 1366.82峰（所有碳-12）的90%。为了得到精确的数据库，图谱必须简化为只有碳-12峰。这一过程通常使用如Voyager Explorer等类似软件实现。

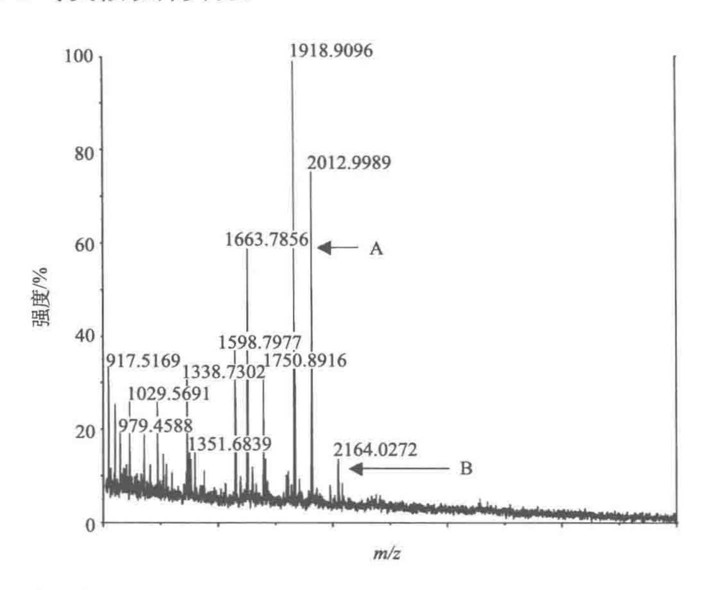


图24.2　基质辅助激光解吸/电离（MALDI）-飞行时间（TOF）质谱分析一个典型的胰蛋白酶消化的凝胶点得到的“原始”质谱（MS）谱图。将一束激光照射在不锈钢平板上一个0.5 μL的凝胶样品点（凝胶栓）的胰蛋白酶消化片段。这是一个典型的胰蛋白酶消化凝胶中蛋白质的例子。每个峰代表一个消化生成的不同多肽片段。峰**A**是 m/z（质量/电荷）值为2012.99的蛋白质消化产生的肽段。峰**B**是从胰蛋白酶水解肽段。胰蛋白酶可以切割其自身（也称自催化）。使用这些自消化峰校正质谱可以更精确地搜寻并确定蛋白质的分子质量

（4）正确编辑质谱之后，可使用许多不同程序检索数据库。例如，将碳-12的峰值数据减去自催化片段输入MASCOT，一个网络搜索引擎http://www.matrixscience.com（**图24.4**）。通常情况下，MASCOT搜索允许一个胰蛋白酶切割或甲硫氨酸氧化，以及小于0.1 Da的质量精度误差。其他蛋白酶可以代替胰蛋白酶——包括Lys-C（在赖氨酸残基处切割），Arg-C（在精氨酸残基处切割），糜蛋白酶（在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸残基处切割）和Glu-C（在天冬氨酸和谷氨酸残基处切割）。由半胱氨酸残基的巯基烷基化或其他如丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基的磷酸化导致的额外的固定分子质量的改变也可用于搜索分析。MASCOT返回最有可能匹配质谱中离子质量的信息，包括蛋白质名称，分子质量检索（MOWSE）评分，蛋白质定位号码（匹配选定的数据库），以及完整蛋白质的分子质量。评分基于匹配多肽的质量准确性、匹配多肽的数量以及蛋白质残基的序列覆盖等多种因素。在这种情况下，MASCOT算法确定了多肽质谱数据

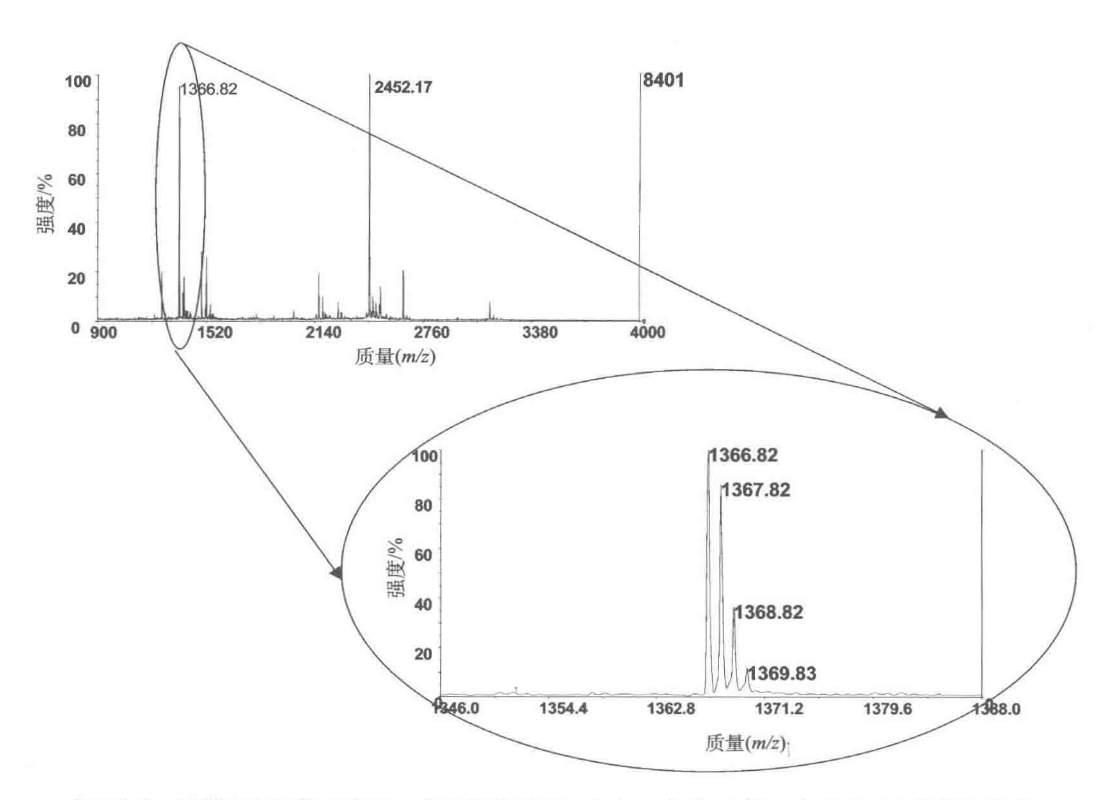
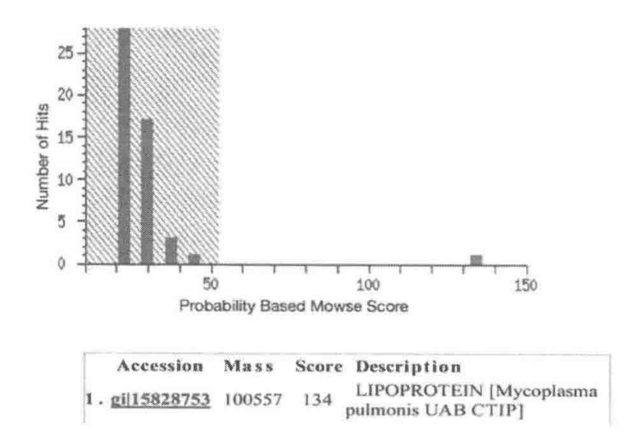


图 24.3　质谱中的同位素分布。在这种情况下，含有一个碳-13 的 m/z 1367.82 的峰强度峰接近 m/z 1366.82 的峰（所有碳-12）



	Accession	Mass	Score	Description
1.	gi|15828753	100557	134	LIPOPROTEIN [Mycoplasma pulmonis UAB CTIP]

图 24.4　肽质量指纹分析时 MASCOT 搜索引擎生成的典型文件。在所示的情况下，阴影中的其他蛋白质被认为是不显著匹配。其他信息，包括质谱中观测到的理论胰蛋白酶片段列表、颜色编码，可通过定位号码（Accession Number）得到

与一种来自肺支原体的“脂蛋白”有最佳匹配度，MOWSE 评分为 134。这一 MOWSE 评分落在 MASCOT 文档的阴影框之外，因此，这一蛋白质被认为是“显著”。MAS-

COT 也提供低显著程度蛋白质的 MOWSE 评分。在之前的例子中，其他蛋白质落在绿色阴影框内，因此为非显著匹配。其他信息与蛋白质定位号码关联，包括理论胰蛋白酶片段序列，以颜色编码显示在质谱中发现的片段。

24.3.12 使用 C-ESI-MS/MS 确认蛋白质

MALDI-TOF 质谱提供推测的蛋白质鉴定，LC-ESI -质谱/质谱（液相色谱电喷雾离子串联质谱）能通过分析母肽段碰撞解离出的离子确认这一鉴定结果。这种类型的 MS 提供关于多肽的氨基酸序列的信息，补充了 MALDI-TOF 质谱分析产生的信息。假设研究人员能够使用有经验的操作者操作的质谱，本节侧重于理解和解释 LC-ESI-MS/MS 实验得到的谱图信息，而不是如何操作仪器。

（1）一组选定的多肽在质谱仪中碎裂成片段，这种分裂称为碰撞诱导解离（Collision-Induced Dissociation，CID），由加速肽离子进入中性氩气引发。主要的断裂位点是在生成“B”和“Y”型离子的酰胺键。B 离子源于 N 端，由包含氢离子的氨基酸残基组成。Y 离子源于 C 端，由氨基酸残基加氢和一分子 H_2O 组成。

（2）**图 24.5** 为 LC-ESI-MS/MS 数据示例，基于 B 和 Y 离子的鉴定，序列已经确定。如图例所示，已知氨基酸残基的质量用于识别在 B 和 Y 离子序列的氨基酸。

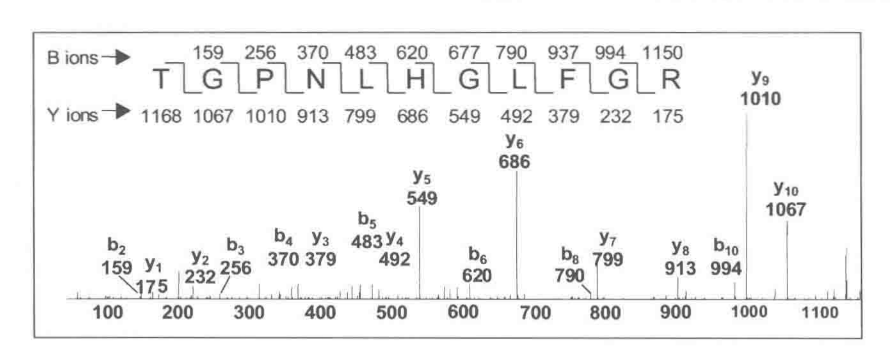


图 24.5 液相色谱法（LC）-电喷雾（ESI）串联质谱法（MS/MS）分析，确定一个肽离子序列。使用以下质量确定氨基酸残基：苏氨酸（T），101.105；甘氨酸（G），57.052；精氨酸（R）156.187；氢，1.008；水，18.015

（3）得到多肽序列后，输入序列至这个免费网站 http://prowl.rockefeller.edu/prowl/proteininfo.html。该网站在 NCBI 非冗余（nr）数据库中搜索，并返回包含该序列的多肽。某些蛋白质家族，如蛋白激酶有共同的同源域，可能需要超过一个肽序列来正面确定一个特定蛋白质。如果序列是“新的”，即在数据库中没有，那么有必要复验数据避免任何错误的释意。应当指出，越来越多的基因组（以及蛋白质组）已被描述。然而，有报道尚未确认来自编码 DNA 链的蛋白质，这提出了一种可能性，即可能有必要考虑 DNA 序列信息翻译的新机制。无论如何，这无疑将迅速出现在蛋白质组学数据库中。

（4）一种流行的鉴定肽序列的替代策略是使用搜索引擎，如 MASCOT 或 SEQUEST。对于后者而言，母肽离子的分子质量首先用来从数据库中选择所有 1 Da 内的

预期肽段。亚数据库内的肽段被独立地连至理论的片段，并与未知的肽段在串联质谱中的离子进行比较。在亚数据库中与未知肽最为契合的肽段被选为“匹配”，并给予评分。此方法允许“确定”多达50 000个肽段。然而，使用对照数据库的实验显示，很大比例的匹配为假阳性。对已知肽串联质谱分析的评分算法的改进，以及重新进行程序，是非常必要的。强烈建议读者参看**注释14**，其中总结了发表质谱分析所获得的蛋白质鉴定结果的指南，这份多肽和蛋白质的鉴定数据发表指南由分子与细胞蛋白质组学工作小组提供（*19*）。**注释15**讨论了明确的蛋白质组学数据如何用于决定其他后续实验的开始。

B_2离子＝T＋G＋氢＝101.105＋57.052＋1.008＝159.165

Y_1离子＝R＋氢＋H_2O＝156.187＋1.008＋18.015＝175.21

Y_2离子＝R＋G＋氢＋H_2O＝156.187＋57.052＋1.008＋18.015＝232

24.3.13　通过二维凝胶蛋白质组学技术研究衰老相关的蛋白质氧化

活性氧积累造成的蛋白质氧化被广泛认为是各种衰老相关疾病过程的一部分，包括类风湿关节炎、白内障、糖尿病、动脉硬化，以及阿茨海默症。这些修饰会以各种方式，如修饰作为维持活性必需的氨基酸、改变三级结构或异常交联影响蛋白质的功能。结合二维电泳的解析能力和Western印迹分析的特异性，可以确定更容易发生衰老相关氧化的蛋白质，以及分析不同处理方式如何影响它们。这里描述的方案使用已确立的Western印迹方法，使用市售抗体识别一个二硝基苯肼（DNPH）衍生化过程产生的共价连接到一氨基酸的二硝基苯（DNP）基团（*22*）。DNPH衍生如**图24.6**所示，证明了衰老的人脑和AD脑比年轻大脑具有更高的氧化蛋白质水平。尽管特定蛋白质（谷氨酰胺合成酶和肌酸激酶）在老年脑中活性降低，但既没有对氧化程度的具体分析，也没有确定哪些蛋白质可能被氧化的全局性的分析工作；然而，这些结果第一次表明，蛋白质氧化水平升高可能是老化过程和AD的病理学的一部分（*23*）。使用这里描述的DNPH衍生方案，AD的脑的二维凝胶和重复Western印迹显示许多蛋白质样品点与相同年龄对照脑的氧化水平不同，但初步定量显示，氧化水平未必在AD中增加，而且没有对样品点的鉴定（*24*）（**图24.7**）。更多的研究使用了相同的DNP衍生物评估总的衰老相关蛋白质的氧化在衰老的野生型或老年痴呆症的转基因小鼠模型中明显增加；但没有尝试检验特定的蛋白质（*25*）。我们的研究表明，重组人肌酸激酶脑亚型（CKB）可以很容易被醛4-羟壬烯醛（4-HNE）在多个位点氧化，而这种氧化降低酶活性（*26*），是Aksenov等人研究（2000）（*27*）的延伸，他们研究发现，CKB在AD脑中氧化水平更高，并提出这是酶活性降低的基础。但是没有任何情况清楚表明蛋白质的氧化与衰老过程或AD的病理过程具有因果关系。显然，必须在这方面做大量的工作。氧化的蛋白质的最初确定可以使用这里描述的方法完成；确定氧化对蛋白质功能的影响的后续实验需要本书中其他章节和本书之外的方案（对于CKB活性分析；见**参考文献*26*，*28***）。

（1）用于蛋白质羰基Western印迹分析的试剂：

（a）OxyBlot蛋白质氧化检测试剂盒（Chemicon International）

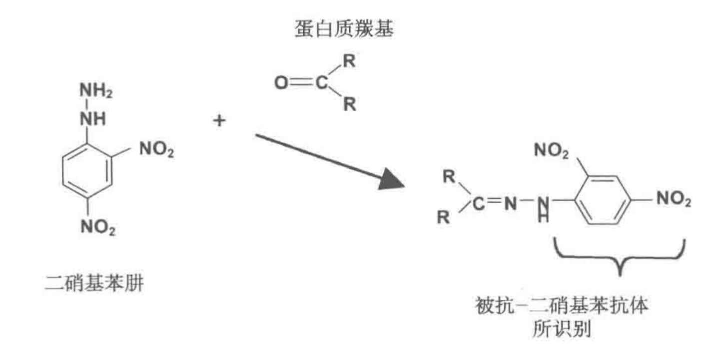


图 24.6　蛋白质羰基与二硝基苯肼的衍生反应。将含有可能被氧化的氨基酸的蛋白质样品与二硝基苯（DNP）共孵育，条件允许后者和羰基发生衍生反应（最常见的氧化形式）。反应产物为 DNP 基团，可用市售抗体识别

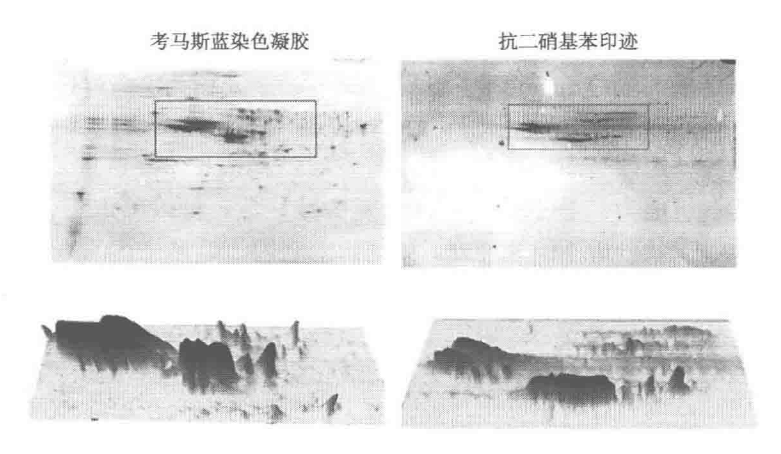


图 24.7　二维 Western 印迹分析与抗二硝基苯肼（DNP）抗体发生免疫反应的样品点。左右两图分别为考马斯蓝染色的凝胶和抗 DNP 印迹的复制胶。目视检查揭示蛋白质样品点的印迹（右图）与凝胶染色（左图）结果一致的区域，切割这部分凝胶用于质谱分析。三维 Blue 观察同一凝胶，比较考马斯蓝染色和抗 DNP 检测的样品点模式的相似性

(b) 18％的 SDS 储备液

(c) Immobilon-FL PVDF 膜（Millipore Corporation）

(d) Odyssey 封闭缓冲液（LiCor Biosciences）

(e) 抗 DNP 的一抗（DakoCytomation）

(f) 结合 Alexa 荧光 680 的羊抗兔二抗（Molecular Probes）

(2) 蛋白质羰基的二硝基苯肼（DNPH）衍生（**图 24.6**）：

(a) 向 10 μL 的包含 30 μg 蛋白质的 IEF 缓冲液加入（参照 24.3.1 节配制）5 μL 的 18％ SDS 储备液，SDS 终浓度为 6％。

(b) 加入 10 μL OxyBlot 蛋白质氧化检测试剂盒中的 DNPH（二硝基苯肼）衍生物溶液；室温孵育 20 min。将整个试管架用铝箔包裹避光，或把架子放在抽屉里。

(c) 加入 7.5 μL 试剂盒中提供的中性缓冲液终止反应。

(3) 甲醇-氯仿蛋白质沉淀。DNPH 衍生物淬灭后，使用氯仿甲醇浸提法沉淀蛋白质：

(a) 加上 4×初始样本量的甲醇，涡旋振荡；

(b) 加入 1×初始样本量的氯仿，涡旋振荡；

(c) 加入 3×初始样本量的水，涡旋振荡；

(d) 10 000 r/min 离心 2 min，弃上清液；

(e) 再加入 3×的初始样本量的甲醇，涡旋振荡；

(f) 10 000 r/min 最后离心 2 min；

(g) 弃上清液，将蛋白质沉淀重悬在 200 μL IEF 裂解缓冲液中；

(h) 使用 Bradford 确定蛋白质浓度。

(4) 蛋白质羰基的二维 Western 印迹分析：

(a) 参照 24.3.1 节所述进行二维电泳。每个样品跑复制胶；按制造商的说明使用 GelCode 蓝染色剂固定和染色；处理 Western 印迹分析中其他未固定的凝胶。

(b) 经 SDS-PAGE 后，在转移缓冲液中平衡未固定的凝胶至少 15 min。目的是使自由的，未与蛋白质结合的 SDS 扩散出凝胶；这一步后弃去缓冲液。

(c) 凝胶平衡时，将 FL-PVDF 膜浸泡在 100%甲醇中活化 5 min——这对水化膜是至关重要的；

(d) 在转移缓冲液中平衡膜 15 min。

(e) 在 Western 印迹盒中的将凝胶与 PVDF 膜组装到一起（将膜预先切到和凝胶的大小相同）。确保凝胶和膜之间没有气泡。可通过先铺平膜，然后再铺凝胶来实现。盒中完整的“三明治”应包括海绵、Whatman 滤纸、膜、凝胶、Whatman 滤纸、海绵。在完整的“三明治”中，凝胶应紧贴膜，否则样品点会发生滑动，转移到膜上的将不是二维凝胶的镜像。

(f) 将盒插入到转移槽中，使凝胶最接近阳极，即转移方向是从凝胶到膜。

(g) 130 mA Electroblot 过夜，转移槽置于充满了冰的托盘中，槽中的缓冲液用搅拌棒搅拌。

(h) 转移之后，从盒中小心取出印迹，进行抗体孵育。

(i) 在 Odyssey 封闭缓冲液中室温搅动封闭 1 h。

(j) 在用 Odyssey 封闭液 1∶2500 稀释的抗 DNP 中孵育 1 h。

(k) 在 TBST 中洗印迹 6 次，每次 10 min。

(l) 在用 Odyssey 封闭缓冲液 1∶5000 稀释的 Alexa Fluor 680 山羊抗兔免疫球蛋白（Ig）G 抗体（Molecular Probes，Eugene，OR）中避光孵育 1 h（用铝箔包裹盒子，或使用避光盒）。

(m) 4℃ 在 TBST 中清洗过夜。

(n) 按照制造商的说明使用 LiCorOdyssey 扫描仪获得印迹图像。

(o) 结合对凝胶印迹的目视检测和 Western 印迹图像，以及如 24.3.7 节所述的 Progenesis 图像分析，决定染色凝胶用于 MS 处理的点。

（5）MALDI-TOF-MS。切割凝胶点，并参照 24.3.11 节进行 MALDI-TOF-MS。

（6）使用 LC-ESI-MS/MS 鉴定蛋白质的修饰：Western 印迹可以给出翻译后修饰甚至定量，但是不能识别蛋白质的修饰位点。识别蛋白质上准确的化学修饰，并将其定位至一个特定的氨基酸残基，不但能够证实 Western 印迹所指出的修饰，也给出功能方面的一些见解。

定位修饰位点往往很困难。使用未修饰蛋白质作为对照，与修饰蛋白质比较，是解析光谱和确定修饰氨基酸时必不可少的步骤。该方法与 24.3.12 节描述的相同，Aslan 等（2003）（***29***）和 Isom 等（2004）（***30***）也描述过此方法。

在**图 24.8** 中，质谱 A 同**图 24.5** 相同。这是一个未经修饰的多肽。质谱 B 是相同的肽，但通过与 4-羟壬烯醛（4-HNE，有醛反应活性）孵化而被氧化。接着，如 24.3.13 节所述，这种氧化的蛋白质与 DNPH 衍生，然后如 24.3.10 节描述，用胰蛋白酶消化过夜。1 个 HNE 加成产生的预期质量位移是 156。与 DNPH 衍生后，1 个 HNE 加成的预期质量位移是 336。谱图 B 中，所有从组氨酸残基（H）到 C 端的 B 离子的质量都增加 336，从 H 到 N 端的 Y 离子也有同样增加。这些数据证实，HNE 加成发生在组氨酸上，且是迈克尔加成。

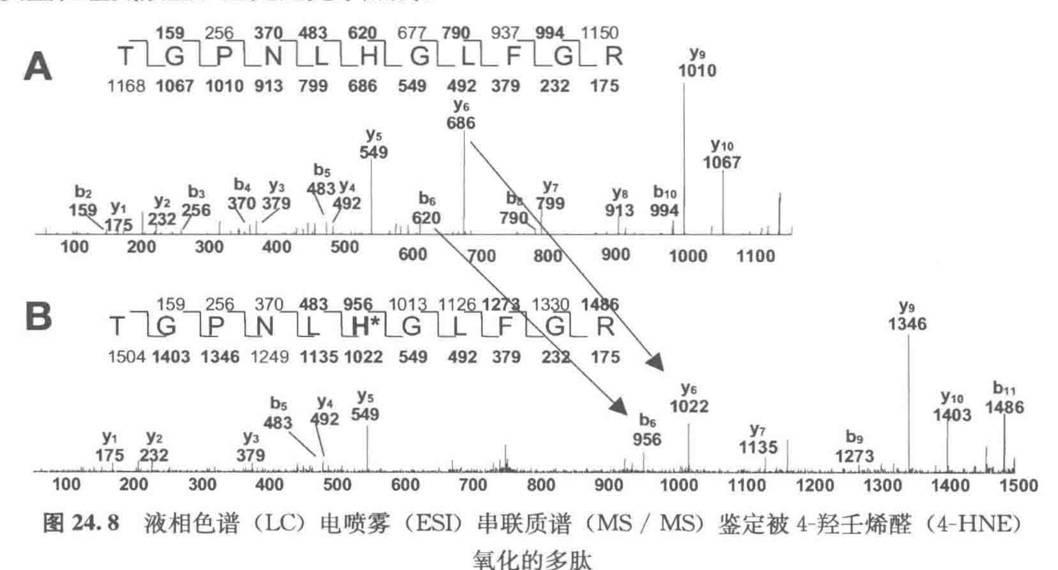


图 24.8　液相色谱（LC）电喷雾（ESI）串联质谱（MS / MS）鉴定被 4-羟壬烯醛（4-HNE）氧化的多肽

（A）来自细胞色素 c 的未修饰多肽；**（B）**和有醛反应活性的 HNE 孵育后的同一多肽。该蛋白质如 24.3.6 节所述与二硝基苯肼衍生，如 24.3.4 节所述胰蛋白酶消化过夜，使用标准程序进行 LC-ESI-MS/MS 分析（***6，29，30***）

24.3.14　分析蛋白质复合物的二维非变性电泳（基于**参考文献 8，9** 所描述的步骤）

“非变性胶”（blue native gel，BN 凝胶）使分析非变性（非解离）的蛋白-蛋白相互作用成为可能，特别是能够通过使用温和的洗涤剂从膜环境分离出没有解离的蛋白复

合物，分析膜环境中的疏水蛋白。该方法最初开发用于分析线粒体内膜中的线粒体氧化复合物（***7～9***），现已开始用于研究细胞质（***31***）或质膜（***32***）中的非线粒体蛋白质复合物。为了防止疏水膜蛋白的重新聚集，缓冲液含有高浓度的氨基己酸。氨基己酸是一个两性离子，自由氨基己酸在凝胶中不迁移，从而避免了在电泳过程中从蛋白质中消耗。最后，在低浓度的考马斯蓝 G-250 进行增溶，考马斯蓝 G-250 与蛋白质结合，致使在所有重要的蛋白质结果中都有相同的带电量，所以他们都在同一方向迁移（在中性 pH 中朝向阳极）。因此，一个有不同本体静电荷量的蛋白质复合物的混合物上样至一非变性胶的顶部，并依据明显的本体分子质量差异分离。一旦开始跑 BN 凝胶，这个凝胶中的一条样品孔道可在 SDS 上样缓冲液中平衡，放在 SDS 凝胶顶部，进行常规的 SDS-PAGE，二维分离一系列蛋白质，而这可能难以通过其他电泳研究手段实现。第二维可以染色并目视评估差异，以确定用于 MS 分析的切割“条带”。

（1）药品和储备液：

（a）考马斯亮蓝 G-250，粉末，室温（非考马斯亮蓝 R）。

（b）月桂酰基-麦芽糖苷（十二烷基-β-D-麦芽糖苷）10% m/V（即 1 mL 水溶解 0.1 g），−20℃保存。

（c）参考**表 24.5** 配制 BN 电泳缓冲液储备液。

（d）高分子质量标准（Pharmacia Biotech）。

（e）在 200 μL 提取缓冲液中重悬一小瓶，然后加入 25 μL 重悬一小瓶-麦芽糖苷，放在冰上 20 min。

（f）胶上样之前，向标准混合物中加入 12.5 μL 考马斯亮蓝（含有氨基己酸）。−20℃储存剩余部分。

（2）第一维 BN 凝胶（**表 24.6**）：

（a）使用洁净的玻璃板和 0.75 mm 垫片组装凝胶盒。

（b）在 10 mL 量筒中准备一系列浓度梯度的丙烯酰胺各 10 mL。用冷水定容后，用封口膜密封，上下颠倒若干次轻轻混匀，然后将其置于一冰桶中，直到可以倒出凝胶。注意保持冷冻，否则丙烯酰胺会在倒出凝胶前开始聚合。

（c）关闭小室之间的连接，首先用 4.2 mL 12%丙烯酰胺填充右边（最接近凝胶）。

（d）打开连接，使 12%的丙烯酰胺填满连接，可以看到它流入其他槽内。这可以防止气泡被困在连接中从而阻碍两槽间的流动。最好的解决方案是先倒入较浓的溶液，因为浓度高的溶液往往会填满连接。用 5%的丙烯酰胺填满离出口较远的槽；其水平应勉强超过 12%的丙烯酰胺。

（e）在两槽都被填满后，两边都加入 APS 和 TEMED，旋转塑料移液器枪头，保证快速彻底的混合。

（f）启动搅拌棒轻轻搅拌包含更高百分比丙烯酰胺的槽；应保持槽中有一个涡旋，但不能引入气泡。

（g）加入 APS 和 TEMED 后，尽快打开槽上最接近凝胶的活塞，让溶液通过与流出管接触的移液枪头进入凝胶盒；为保证稳定，枪头应该贴在凝胶板之间的组件上。降

低搅拌棒速度，当接近底部时，尽量减少进入凝胶的气泡。能够看到流入右室的不同浓度的丙烯酰胺混合。如果看到左侧有梯度混合，则意味着有回流，凝胶可能出现非重现性的梯度不连续性。此时如有疑虑，应待凝胶聚合后将其丢弃并重新制作。倾斜整个混合器，使得最后一点凝胶溶液进入凝胶组件。

(h) 当所有的凝胶溶液都倒出梯度器后，把枪头从胶中移走，贴在一个废物烧杯边缘，并立即向梯度器的两槽内倒水，并让其流入废弃物容器，以防止残余丙烯酰胺在管道内聚合，或在槽内干燥。倾斜组件使槽中的水都流入废物缸。

(i) 为更简便地制造更多可重现的梯，需要使用蠕动泵。它可以通过使梯度制造器高于凝胶使流动开始，且可以更好地控制流量。此外，在浇注凝胶后冲洗泵更为容易。

(j) 用水冲洗梯度制造器后，用水-饱和异丁醇轻轻覆盖在凝胶上。该溶液比水轻，因此滴加到刚注入的凝胶上时，对丙烯酰胺顶部的搅动较为轻微。尽管如此，应该注意尽量减少对凝胶的搅动，以保持刚刚浇注的梯度。用塑料吸管在凝胶一侧滴加异丁醇，让丁醇层“滑过”未聚合的凝胶溶液顶部，直到它到达另一边。不要让它“炸裂”凝胶；如果发生这种情况，应丢弃凝胶。

(k) 倒入浓缩胶时，在聚合的分离胶上面部分插入所需的“梳子”（10 孔或 15 孔），这样形成的浓缩胶的顶部将高于凝胶板，倒入用作浓缩胶的丙烯酰胺溶液，让它稍微溢出。然后将梳子滑入到凝胶中，使孔道深度最大，但需留下至少 3～5 mm 以上的浓缩胶和分离胶之间的距离。

(l) 第一维电泳必须冷藏进行，所以要确保缓冲液也是冷的。

(m) 将阳极缓冲液加入电泳槽。

(n) 将凝胶盒从灌注组件中取出，不拿出梳子。使用黑色记号笔在胶玻片朝向盒外的一侧标记孔道底部的位置。

(o) 将胶插入上层缓冲液槽的位置，确保垫片密封，把组件放在一块实验室用布上，向槽内加水以测试其密封性。如果不漏水，把水倒出。

(p) 把胶组件放入装满阳极缓冲液的胶槽中。用 Hi Blue Cathode 装满内槽。

(q) 此时轻轻拔出梳子。仔细观察会看到梳子造出的孔道。

(r) 用一次性凝胶上样移液枪头，向孔道上样制备好的所需样品。10 孔梳最大上样量为 30 μL。

(s) 盖好电泳槽盖，确保盖子扣在了正确的方向上，红色对红色，黑色对黑色。

(t) 把电泳槽拿到冷室，接通电源，打开开关。40V 电泳 1 h 左右，使得蛋白质迁移通过浓缩胶。

(u) 然后吸出内槽缓冲液，并倒入冷的 Lo-Blue 缓冲液。增加电压至 100 V，低温下电泳 2 h。

(v) 在运行结束时，取出胶组件，把 Lo-Blue 缓冲液从内槽倒入水槽内，使用钝头楔子（由 Biorad 公司提供）从边缘打开胶盒，并小心（戴手套）把凝胶放入考马斯蓝中，置于摇床上染色/固定约 2 h。

(w) 凝胶转移到一个装有脱色液的新染色盘中，卷起 Kimwipe，然后放在盘边，远离凝胶。Kimwipe 能结合考马斯亮蓝，加速脱色。

(x) 完全脱色可能需要一整天，但条带形状在几个小时内就能检测到。

(3) BN 第二维凝胶步骤。使用 Tris-Tricine 胶，由于其对低分子质量多肽有较高的分辨率。对于第二维，BN 凝胶（第一维）不染色或固定。否则蛋白质不会在第二维迁移（配方见**表 24.7**）。

(a) 打开加热块至 80℃。

(b) 从 4℃取出琼脂糖溶液，在加热块上加热。两块凝胶约需要 3 管溶液。

(c) 第一维 BN 完成前，准备第二维凝胶。分析线粒体复合物的标准凝胶包括 10% 丙烯酰胺层和顶部的 8%丙烯酰胺层。至于其他样品，最佳组合需依经验确定。可能只是简单的 10%层就足够了。

(d) 在第一维 BN 之前组装凝胶盒。用一把尺子预标记距凝胶板底部 5.5 cm 的位置，这一高度保证了 10%层的最大分离度。使用带有自动分液器的一次性 10 mL 移液器倒入丙烯酰胺溶液。与第一维一样，使用水-饱和异丁醇覆盖凝胶。

(e) 当 10%层聚合后，倒入浓缩胶至距胶板顶部 5 mm 以内；这允许凝胶上方有足够的深度使第一维胶滑入孔道。8%层的具体的深度并不重要，但如果在实验中有多块凝胶进行第二维电泳，需要保证所有凝胶高度相同。

(f) 确保琼脂糖溶液彻底加热至能够自由流动。当它能在塑料吸管中自由上下移动时，就可以使用了。

(4) 准备第二维 BN 胶孔道：

(a) 拆开第一维的凝胶盒，用刀片切开浓缩胶和分离胶，弃去浓缩胶。

(b) 然后用一个单面刀片，从顶部量起，从 BN 胶切去和刀片长度相当的一条孔道。这就避免了聚集在底端的大量蓝色“滴”。

(c) 切下宽度不超过 5 mm 的 BN 孔道。

(d) 第二维凝胶倾斜一定的角度，向其上层浓缩胶的上方加入热琼脂糖溶液。轻柔但迅速地把两个 BN 孔道中的一个滑入到板之间的空间里，让它一直滑到左侧。

(e) 将另一个 BN 孔道插入到第一个旁边，朝向与第一个相同。

(f) 在热的琼脂糖的一端插入 Teflon 梳子，形成上标准样品的孔道，注意不要把它推入 BN 胶以下。

(g) 最后，在 BN 胶孔道上滴变性溶液以确保变性。让整个体系静置 15～30 min。

(h) 开始 30 V 进行电泳大约 1 h，或直到样品迁移出 BN 胶且染料迁移前端已可见。

(i) 增加至 120 V，电泳约 2 h，或直至最小的标准样品到达胶的底部。

(j) 拆开并用考马斯亮蓝染色。**图 24.9** 示此方法可获得的信息。

参见**注释 16** 关于 BN 胶的进一步讨论，以及**注释 17** 关于 BN 和传统二维凝胶的对比的讨论。

表 24.5 非变性电泳的储备液

缓冲液（及所需体积）	成分	浓度	储备液用量
阴极（上方）	Tricine	50 mmol/L	4.48 g
缓冲液（500 mL）	BisTris	15 mmol/L	1.57 g
Blue-Free：不含考马斯亮蓝的阴极缓冲液			
Hi-Blue：使用 0.1 g 考马斯亮蓝，调节浓度至 0.02%			
Lo-Blue：使用 0.01 g 考马斯亮蓝，调节浓度至 0.002%			
胶缓冲液（50 mL）	氨基己酸	1.5 mol/L	9.84 g
	BisTris	150 mmol/L	1.57 g
阳极缓冲液（500 mL）	BisTris	50 mmol/L	5.23 g
提取缓冲液（10 mL）	氨基己酸	0.75 mol/L	0.984 g
	BisTris	50 mmol/L	0.105 g
考马斯亮蓝（10 mL）	氨基己酸	0.5 mol/L	0.66 g
	考马斯亮蓝	5%	0.5 g

表 24.6 第一维非变性胶

	5%丙烯酰胺	12%丙烯酰胺	4% 浓缩胶
原胶	1.80 mL	4.3 mL	0.6 mL
胶缓冲液	3.5 mL	3.5 mL	1.5 mL
甘油	—	1.10 mL	—
水	至 10 mL	至 10 mL	至 4.3 mL
10% APS	27.6 μL	27.6 μL	70 μL
TEMED	4.2 μL	4.2 μL	9 μL

表 24.7 第二维非变性电泳溶液

	成分	浓度	1 L 所需的量
阴极缓冲液（1×）	Tris	100 mmol/L	12.11 g
	Tricine	100 mmol/L	17.92 g
	SDS	0.1%	1 g
阳极缓冲液（1 L）	Tris	200 mmol/L	24.23 g，pH 8.9
胶缓冲液（10×）	Tris	3 mol/L	每 100 mL 36.3 g
	SDS	0.3%	0.3 g
琼脂糖溶液	琼脂糖储备液（1%溶于水中）		7 mL
（4℃保存）	ddH_2O		2.5 mL
	SDS（10%）		0.5 mL
	β-ME		10 mL
开始第二维之前现用现配			
变性溶液	ddH_2O	9 mL	
	SDS（10%）	1 mL	
	β-ME	100 μL	

表 24.8　非变性电泳的第二维凝胶

	10%部分	8%部分
Tris-Tricine 缓冲液	2.5 mL	1.16 mL
Protogel	2.4 mL	0.93 mL
水	2.0 mL	1.13 mL
甘油	0.6 mL	0.28 mL
10% APS	25 μL	25 μL
TEMED	2.5 μL	2.5 μL

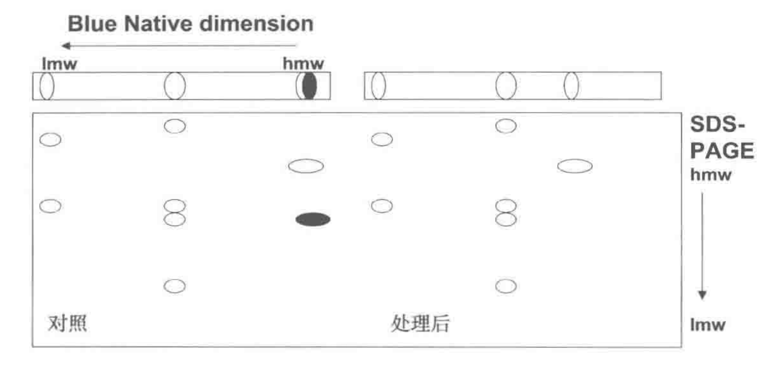


图 24.9　二维非变性电泳示意图。在此方法中，第一维非变性电泳分离蛋白质复合物，所谓的 Blue Native（BN），因为向蛋白质中混合了考马斯蓝 G，与蛋白质有离子相互作用，使所有的蛋白质和蛋白质复合物带类似的电荷，因而都响应电流向同一方向迁移。在第一维之后，切下孔道，在十二烷基硫酸钠（SDS）和还原剂中平衡，并放在传统 SDS -聚丙烯酰胺凝胶顶部，然后复合物的组分按分子质量分离。本图示一个组分的差异（黑色椭圆形），一个复合物中缺失一个组分，致使它在 BN 维度中有不同的迁移，表明其组成有差异。第二维分析表明黑色组分缺失，导致该组分在 BN 维度中以一个较低的分子质量迁移

24.4　注释

（1）基本的品质量控制：考虑什么是我们所说的品质量控制？“品质”指的是数据的良好程度，质量控制则指的是一实验方案如何产生尽可能好的数据。评价数据的好坏有几个参数：是否可重现、无偏差，以及具有生物学意义。**注释 2** 和 **4～6** 将解释这些问题。这些都不是专门针对衰老相关研究的，但当涉及时间点时，如在阐释衰老的许多实验中，重视品质控制是产生有意义数据的关键。

（2）认识偏差来源：即使是在蛋白质组分析开始之前，偏差就可能由仪器引入，取决于样品的收集、处理或储存方法。如果有可能，应当随机采集生物样品，避免在同一天收集类似的样品，而在另一天收集另外一组样品。在计时的实验中，时间点明显地支配着样品采集的非随机顺序。为了尽量减少偏差，确保所有样品都收集在同一类型的管/容器中，并使用相同的终止方案。最好以随机顺序开始实验，以随机顺序收集不同时

间点的样品，而不是从培养时间最短的到培养时间最长的。如果做不到，那么在接下来的实验中应随机分配样品，这样，分析的时间将不再是一个偏差因素。样品处理和存储是多样品分析中的重要问题。“同质化”所指的可以是不同的东西，甚至是不同的技术人员。如果有可能，应由同一个人处理一个数据集中的所有样品，使用同一型号的均质器和其他相设备。例如，脑样品的匀质化不应该一天使用玻璃-玻璃匀质器，另一天却使用玻璃-聚四氟乙烯匀质系统。同样，所有样品的离心条件应完全相同。室温可能有所变化。离心机应设置在 22℃或 20℃。准确的条件通常是次要的，但重要的是，要对所有样品使用同样的条件。

随机化以减少偏差：在实验过程中偏差可能在意想不到的地方出现。在大的 Bio-Rad 槽内设置 Western 印迹盒时，3 个盒可以同时进行。但应注意在不同的盒中设置复制组，且只可以比较同一盒内的样品，因此，不同盒位置的电流差异导致的转移差异对比较的两个样品有同样的影响。注意不同盒中转移的复制组的蛋白质模式是否相同，可以确定位置影响转移的程度，如果位置确实影响转移，则所有进行比较的样本需在同一个盒内转移，但复制组可以在不同的盒中转移。

（3）理解二维凝胶中使用的化学：IEF 前的还原和烷基化可能带来差异。这里所描述的 SDS-PAGE 之前 IPG 条带的还原和烷基化的方案在我们和其他人尝试过的多种样品中的效果都很好。然而，最近有系统的分析显示，在含 SDS 的缓冲液中，IAA 烷基化在 1 h 后仍不完全，而 CHAPS 对烷基化的抑制则很小（***33***），表明 IEF 步骤之前在 IEF 缓冲液中的烷基化效率可能远远超过在 SDS 缓冲液中平衡的效率；此外，IAA 的烷基化效率远远小于乙烯吡啶家族（***33***）。Bai 等（2005）最近发现，乙烯吡啶烷基化使得二维凝胶基本区域内的分辨率更高，反映了较为完全的烷基化，以及较少的二硫键桥重形成/形成（***34***）。包括本章在内的众多蛋白质组学出版物结果表明应考虑到还原和烷基化条件。总体来讲，研究人员要注意优化即使在他们看来是“标准”的方案；设定为“标准”的步骤往往没有被仔细评估并验证，这些步骤可能是根据特定样品或实验优化的。

（4）减少胶间差异：我们发现传统二维电泳中，在第二维使用单浓度丙烯酰胺凝胶比梯度凝胶得到更多令人满意的结果。单一浓度避免了制备丙烯酰胺梯度时不可避免发生的胶间差异，即使是“机器灌注”的市售预制胶。机器是由人操作的，因此不必惊讶于同一批次处理的梯度凝胶，或不同批次间的凝胶不同。单浓度凝胶中，这种胶间差异是非常小的影响因素。

（5）生物复制数：当处理多个样品时，注意生物复制的总数，在二维凝胶分析之前要决定是否设置技术复制。为了尽量减少技术人员的差异，或分析日期造成的差异，或仪器差异，要列出所有样品，然后由一名统计人员进行随机分配，从而在一天中，以一个特定但随机的顺序处理样品集。如果进行技术复制分析，给定的生物样品的复制应在不同天处理，以制造日期差异。如果没有统计人员，将样品编号写在纸片上，装在容器中，分析时一个一个地随机抽出，会有很大帮助。

（6）凝胶随机上样和系统上样：常规 SDS-PAGE 样品上样通常依照一定顺序，如对照在一侧，而不同实验组以递增或递减的顺序，上样位置离对照组较远。但是，最好

随机上样，以避免某些系统上影响凝胶水平方向的因素产生的偏差。这样，如果处理方式有影响，信号方式将不对称地分布在不同的孔道上。密度计能够揭示定量差异。凝胶孔道可以重新定位在硅片上，以生成一个更容易在出版物中阐释的图像。**图 24.10** 说明了这一点。

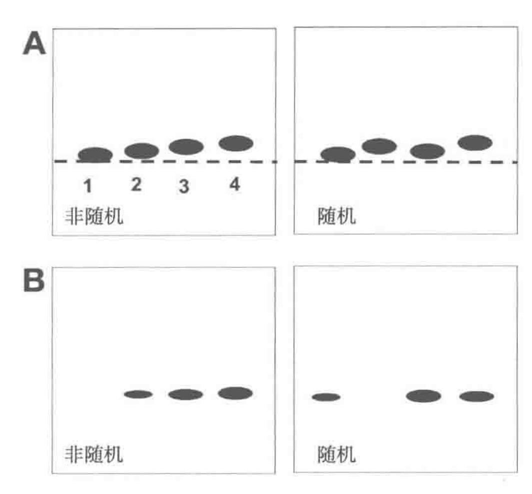


图 24.10　十二烷基硫酸钠（SDS）聚丙烯酰胺（PAGE）凝胶中或 Western 印迹中的随机样品有助于检测非随机数据。**A** 和 **B** 为两个 SDS-PAGE 凝胶示例，按有实验意义的顺序上样，能够得到与实验条件或时间相关的差别。但是，A 中条带显示分子质量从左至右略微升高（与硅片上画出的水平线相比）的偏移模式，这可能是由于凝胶中一侧到另一侧的电流不同，或胶接触印迹膜时放歪了。通过随机顺序上样，更容易发现分子质量的差异，虽然视觉上不如第一次美观。得到随机上样的凝胶/印迹之后，可以证实迁移位置的差异，然后在硅片中“切”下，重新排列显示逐步的偏移以便发表。在 **B** 中，非随机的凝胶上样显示出对照样品的空白信号（1 道），以及随时间增加的信号（2～4 道）。然而，不能明确排除一些边缘效应造成了 1 道的空白，以及一些整体系统性的凝胶印迹差异造成了明显的信号差异。通过重新随机上样，确认了对照组信号的缺失，以及其他组的显著差异。同样，这些信号都可以使用密度计定量，并重新以时间的先后顺序排列，如左图所示。因此，**A** 和 **B** 都强调了分析某个刺激导致生物样品产生定量变化中随机上样的重要性，当上样顺序本身不产生一种“模式”时，能够更容易地辨识细微的迁移或强度的差异

（7）二维凝胶染色：Sypro Ruby 要避光！我们发现凝胶在 Sypro Ruby 中过夜染色能提供最为前后一致的结果。整个染色过程中都需要小心保护凝胶避光，直至获得图像。凝胶被扫描之后，应贮存在避光条件下，直到完全确定不再需要。

（8）染色顺序的影响：凝胶在 Sypro Ruby 染色后可以使用考马斯亮蓝染色，反之则不可以。

（9）同时染色多个凝胶时一些实际的考虑：不论什么样的染色，盘中要有足够的溶液使得在染色/脱色的过程中，凝胶能够离开容器的底部而浮动。多个凝胶的染色可以在同一个盘中进行，但要在凝胶的角上做不对称标记以区分，或以特定的顺序堆叠在一

个容器中，使它们没有足够的空间重新排列。确保容器中有足够的液体使凝胶彼此分开，相互黏附的凝胶将导致凝胶撕裂。最后，确保“摇动”的速度，使凝胶不“坐”在盘底，造成染色或脱色不均匀。向摇床上的容器中放入凝胶时，观察并调节摇晃速度。

（10）MS 分析时使用考马斯蓝或 Sypro Ruby 染色：虽然考马斯蓝和 Sypro Ruby 染色并不如银染敏感，但后者会改变赖氨酸和精氨酸，而考马斯亮蓝和 Sypro Ruby 不影响蛋白质共价键。因此，除非已经知道感兴趣的蛋白质丰度低，且如果不用银染的话检测困难，建议用考马斯蓝或 Sypro Ruby 染色。**参考文献 *35*** 描述了原始银染色的变体方法，且银染后允许用于 MS 分析（***36***）。此外，银染凝胶可以用于图像分析（虽然银染的动态范围很窄），考马斯亮蓝或 Sypro Ruby 染色的样品可用于质谱分析，用银染的凝胶检出感兴趣的样品点之后，重新以更高的上样量进行电泳（***37***）。

（11）二维凝胶蛋白质组学是一个反复的过程。一旦统计分析确定了显著差异的一列样品点，需要“挑出”这些样品点用于 MS 分析，电脑前的操作人员观察凝胶图像，看统计确定的点是否在图像上有差异。没有哪个分析过程是完美的，有可能统计分析将一个污点当做两组之间显著差异的样品点，而对用户来说这似乎是一个应该排除的污点。然而统计分析无视图像，分析的对象通常为标准化的凝胶上样品点的强度，因此，放大一个给定的样品点以评估它是否与另一凝胶上相同的样品点丰度不同，可能得出与统计分析的不一致的结果。但重要的一点是，统计分析之后，返回图像一个点一个点地评估：①比较的点是否为同样的点；②到底是一个“点”还是“条纹”，如果是后者，是否应该排除，或以不同的方式检测；③能否目测分析显示的样品点的数值关系。由于生物样品的二维凝胶的复杂性，除非差异因子大于 2～3，否则很难看出两个凝胶样品点的差异。但是总体而言，应该可以看出不同组的点强度的差异与统计分析是否一致。如果多数差异在 1.5～2 倍内，则尤其需要再使用独立的方法验证差异，如 Western 印迹法（***6***）。**图 24.11** 示优化二维凝胶分析的迭代性质。

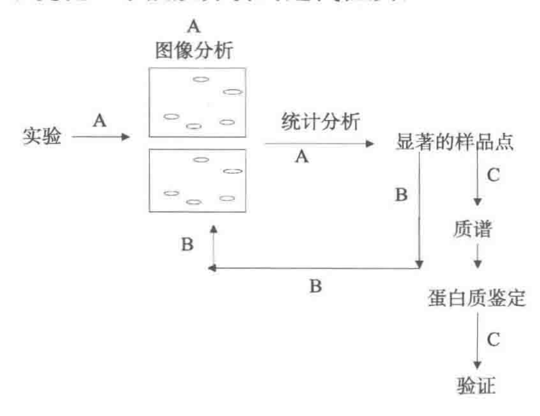


图 24.11 有效的二维（2D）凝胶蛋白质组学涉及迭代分析。在首轮的分析中（**A**），对实验中的二维凝胶样品进行图像和统计分析，均产生一列显著的样品点。它们在 **B** 轮中与直观的图像比较，检查错点，并排除应删除的点。这种迭代可能多于 1 轮。最后，切下凝胶上一致的一组点，并按 **C** 路径质谱分析，确定蛋白质。可进一步通过如使用已知特定抗体的 Western 印迹等独立过程来验证

（12）DIGE：单一样本，单一凝胶的替换方案：本章中，我们描述了二维凝胶方法，其中一个样本是在一个单一的凝胶上解析，用 Sypro Ruby 或考马斯蓝染色，多个二维凝胶图像则使用软件辅助图像和统计分析，以确定“显著”的样品点。在本章结束之前有必要提出 DIGE（***38***）。DIGE 使用大尺寸凝胶，以补充标准的二维凝胶。最近涉及大样品集，尤其是临床样品的研究，已经证明从确定动物群体，如同龄正常雌性大鼠中获得的特定组织可以有充足的蛋白质组学差异，而比较单个样品需要许多生物复制。此外，为确保二维凝胶上的一个给定的模式是“真实”的，可能需要进行每个样品的技术复制。一般建议每个实验组 8 只动物，以提供足够强的说服力。因此，对于一个单一样本/单凝胶实验，如果有 2 个饮食组，每组 8 只动物，每一动物组织（如肝脏）3 块凝胶，则一共是 48 块胶。通过这些凝胶，我们发现每组动物间有充足的变异，以至统计显著的实验诱导差异将成为一个非同小可的挑战。基于上述理由，我们实施了 DIGE 方法，其中，用于比较的类似的蛋白质样品，如大脑匀浆，使用不同的低分子质量荧光染料共价标记，并在同一凝胶上共同电泳。用第三种染料标记的一个实验组中的所有样品混合物亦在同一块胶上电泳。这些染料，Cy3、Cy5 和 Cy2，在不同波长产生荧光，因此能够在同一凝胶上被量化。DIGE 的优点在于，相同的蛋白质共同迁移，这当然是不言自明的。但事实上，由于胶间差异，经常可以发现同样蛋白质的 xy 坐标有轻微或显著不同。计算样品点的生物学差异而非技术差异成为一项统计挑战，特别是对低丰度蛋白质。使用 DIGE 技术时，虽然仍然存在胶间差异，但因为通常要分析多个成对样品，每块胶上的混合标准样品和成对的样品大大降低了需要处理的差异。最近的报告显示，尽管 Cy 染色价格很高，但大大减少了凝胶的数目，内部标准样品使得仅用 6 块凝胶就可以从有 18 个样品的临床研究数据集中产生有统计学意义的数据（***34***）。最近，有文献以较长的篇幅讨论了 DIGE 的优点（***40***）。

然而，并没有完美的技术。DIGE 中蛋白质标记据说会引入过多差异。特别是因为该技术的基础是最小的赖氨酸标记，而更多的标记导致质量改变，从而使被标记点迁移，几个百分点的差异（期望的标记程度只有 1%～3%）就显得过大。此外，凝胶电泳后必须立即扫描；尚未开发出使凝胶在扫描之前保持化学性质稳定的固定方案，所以必须定时进行第二维电泳，以便接下来的扫描。但好消息是，凝胶电泳后可立即扫描，即不需要进一步染色。此外，凝胶贴附在板上，因此凝胶抓握、撕裂或泡胀不均匀等都不是问题。用于 DIGE 的 DeCyder（GE Healthcare）图像分析软件最近的升级包括一个模块（扩展数据分析），能通过包括主成分分析和判别分析以及 t 和 F 检验等标准统计算法处理从 DeCyder 分析获得的图像分析的数据（GE）。Cy 染色的蛋白质样品标记、DIGE 方法学以及 DeCyder 的详细方案可以从 GE Healthcare 网站下载。我们期望，对于复杂的特别是那些受老化影响的蛋白质组，如大脑，利用如 DIGE 的技术可以减少样品间的技术差异，并提高对真正差异的分辨率，这将有助于理解导致病理的衰老相关过程的分子基础。

（13）有意义的蛋白质组学数据，特别是就衰老相关问题而言：“真实”数据。数据可以是“真实”，但它们有意义吗？这是高通量的方法，如二维凝胶和 MS 产生的数据的核心矛盾。凝胶点的丰度可能在实验和对照之间，或在衰老和分化的细胞之间不同，

但这些差异是否为所分析生物现象的原因？简单想来，蛋白质组学数据中有三类“真实”差异。第一类是系统响应刺激或在确定衰老相关疾病的条件中涉及的蛋白质的差异。第二类蛋白质的差异可能发生在响应同样的刺激时，或可能也与衰老相关疾病的发展有关联，但在两种情况下都不是必要的。最后的一类是，一系列蛋白质的差异在疾病的状况，或响应刺激中都是“真实”的，但这些可能属于针对自身反应的细胞反应，试图通过阻止其他蛋白质的改变维持稳态，或受到侵害（如氧化应激）时的保护性反应。所有这些蛋白质差异都是真实且显著的。完成实验并生成蛋白质组学数据之后，研究人员的任务是考虑以上的可能性，破译蛋白质差异的不同种类。

(14) 最初由 Carr 等提出的发表 MS 的蛋白质鉴定数据的指导方案（2004）(***19***) 总结如下：

(a) 作者应该说明如何使用搜索引擎产生峰值序列，确认使用的搜索引擎，并描述如何使用该软件分配多肽和蛋白质——应指出临界评分。还应给出数据库的版本和蛋白质的记录。

(b) 应提供关于序列覆盖的信息——注意同一肽的不同形式（如 Met-ox 和 Deamidated 形式）应计为一个肽。

(c) 若鉴定蛋白质序列时只报道一个肽，应提供这个肽的 m/z 和电荷状态以及 MS/MS 谱图拟合得分。

(d) 当得出一个肽匹配一个蛋白质（或其翻译后修饰）的生物学结论时，应在正文或补充材料中提供 MS/MS 谱图提供。

(e) 可以使用肽质量指纹数据，但需要有较高水平。必须给出质量精度和质量分辨率的信息、校准方法，以及是否排除共同的污染物峰。需要给出覆盖的蛋白质序列，列出不匹配的峰。对 (a) 而言，应对计分方法加以说明。

(f) 确定每个序列是否存在多个蛋白质记录，以及选取的特定序列。

(g) 我们建议，如果没有特别要求，所有的 MS / MS 谱图在补充材料中给出。

(15) 认识什么是蛋白质组学数据：本章的目标不是深入讨论跟进或验证蛋白质组数据的不同方法，这将需要另一个篇章。但很显然，一列特定蛋白质的丰度差异是一个实验的结束，却是另一个或多个实验的开始。根据个人经验、系统的已知信息以及对衰老相关疾病的演化过程或系统如何尝试防止以及是否感兴趣来决定跟进或验证哪种蛋白质的改变。本卷中其他章节描述的许多方法和实验范例提供了挖掘蛋白质组数据的宝贵系统，由其他实验得到的数据补充或验证蛋白质组数据 。

(16) 非变性胶（blue native gel，BN 胶）：研究人员已经开始探索用 BN 方法研究衰老相关疾病的蛋白质相互作用的可能性（***32***）。这种方法的特点是：一维凝胶解析多个样品中的蛋白质复合物，并在第二维中评估它们在疾病中或响应不同的刺激时的差异。例如，最近的研究表明，肝线粒体早期的蛋白质组与基因组变化与早期阶段酒精性肝损伤有关（***9***）。正如**图 24.9** 所示，二维电泳方法可以描述复杂的成分中定性和定量的差异。与传统的 Western 印迹结合，BN 电泳初步分析蛋白质的结合，并提供对疾病相关的功能蛋白差异的强大的初步分析。

(17) 二维非变性胶与传统二维凝胶：BN 和传统二维凝胶以不同方式解析蛋白质，

因此，如果有足够的生物样品，两种方法最好都进行。如果对实验组之间球蛋白的差异了解很少，常规二维凝胶是一个很好的起点。但是，应该牢记，当样品未经分离［亚细胞分离或生化分离（色谱法）］时，二维凝胶分析只能揭示“唾手可得”的结果，即在二维凝胶上样的 100 μg 或 200 μg 蛋白质中丰度最高的蛋白质。在 Bio Rad 的标准胶上，典型的分辨率将解析出约 300 个样品点。使用如 GE Healthcare 提供的大型胶时，将解析并检测出更多的样品点（多达几千个），但类似地，即使在使用大型胶时，蛋白质组亚分离也将大大提高分析效率。BN 凝胶的价值在于，可以获得衰老相关过程中涉及蛋白质的相互作用的功能性蛋白质的差异。起始 BN 二维凝胶的视觉评估可能显示需要在第一维以不同的丙烯酰胺梯度进行额外的 BN 凝胶，以解析某一特定分子质量范围内的条带。这里给出的 BN 凝胶参数用于分析线粒体复合物，对于其他膜相关复合物或细胞质复合物而言，可能不是最佳方案。

24.5　结论：衰老研究中影响蛋白质组学方法的实验问题

本章的目的是介绍衰老相关过程研究中的二维凝胶和 MS-研究方法。本卷其他章节涉及多种其他方法。应该指出的是，同许多其他方法一样，实验条件将决定蛋白质组学分析方法的成败。由于蛋白质组学方法昂贵且需要大量人力，研究衰老过程的蛋白质组学实验时应设置多个目标，包括减少蛋白质组复杂性和增加生物特异性。前者可以如前所述，通过各种亚分离方式实现。生物特异性的实现，可通过预先确定在哪些特定的年龄进行蛋白质组学分析以检测差异，年龄可以通过行为学研究确定。如果不知道特定的年龄，那么对蛋白质组在衰老过程中不同时间点的变化信息的获取就变成了蛋白质组学实验。在细胞培养实验中可以进行同样的滴定，以确保刺激物的浓度对表型有最大程度的影响（解决衰老相关问题细胞培养方法的更完整的讨论参见第 2 章）。有时，通过检验同一器官内部功能不同的区域，如大脑的海马区，也可以提高蛋白质组学实验的生物特异性。然而，就衰老研究的蛋白质组数据而言，必须记住，这些与衰老现象相关的差异只是不同蛋白质差异的混合，其中一些可能会导致衰老过程，另一些可能是“真正”的差异，但与衰老并没有因果关系，还有一些可能试图对抗“衰老”的过程。蛋白质组数据应被视为生物的“快照”；得到更多的数据，就能获取更多详细信息。单个快照可能具有很多数据，但包含的实际信息却很少。

参考文献

1. O’ Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.

2. Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., et al. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**, 317-339.

3. Gorg, A., Postel, W., and Gunther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**, 531-546.

4. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., and Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.

5. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., and Yoshida, T. (1988) Protein and polymer analyses up to m/z 100, 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151-153.
6. Deshane, J., Chaves, L., Sarikonda, K. V., et al. (2004) Proteomics analysis of rat brain protein modulations by grape seed extract. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 7872-7883.
7. Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
8. Brookes, P. S., Pinner, A., Ramachandran, A., et al. (2002) High-throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signalling complexes. *Proteomics* **2**, 2969-2977.
9. Venkatraman, A., Landar, A., Davis, A. J., et al. (2004) Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 22, 092-22, 101.
10. Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. (eds) (2004) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin: p. 1997.
11. Bernard, K. R., Jonscher, K. R., Resing, K. A., and Ahn, N. G. (2004) Methods in functional proteomics: two-dimensional polyarylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients, in-gel digestion, and identification of proteins by mass spectrometry, in *MAP Kinase Signaling Protocols* (Seger, R., ed.). Humana, Totowa NJ: pp. 263-282.
12. Kim, H., Page, G., and Barnes, S. (2004) Proteomics and mass spectrometry in nutrition research. *Nutrition* **20**, 155-165.
13. Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R., III (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19**, 242-247.
14. Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994-999.
15. Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., and Fenselau, C. (2001) Proteolytic ^{18}O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Anal. Chem.* **73**, 2836-2842.
16. Kelleher, N. L., Taylor, S. V., Grannis, D., et al. (1998) Efficient sequence analysis of the six gene products (7-74 kDa) from the *Escherichia coli* thiamin biosynthetic operon by tandem high-resolution mass spectrometry. *Protein Sci.* **7**, 1796-1801.
17. Comisarow, M. B. and Marshall, A. G. (1996) The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy. *J. Mass Spectrom.* **31**, 581-585.
18. Senko, M. W., Hendrickson, C. L., Pasa-Tolic, L., et al. (1996) Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance at 9. 4 T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1824-1828.
19. Carr, S., Aebersold, R., Baldwin, M., Burlingame, A., Clauser, K., and Nesvizhskii, A. (2004) The need for guidelines in publication of peptide and protein identification data. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 531-533.
20. Meleth, S., Deshane, J., and Kim, H. (2005) The case for well-conducted experiments to validate statistical protocols for 2D gels: different pre-processing = different lists of significant proteins. *BMC Biotechnology* **5**, 7.
21. Mardia, K. V., Kent, J. T., and Bibby, J. M. (1995) Chapter 8, in *Multivariate Analysis*. TJ Press (Padstow), Cornwall, UK.
22. Levine, R. L., Williams, J. A., and Stadtman, E. R. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **233**, 346-357.
23. Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., et al. (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10, 540-10, 543.
24. Korolainen, M. A., Goldstein, G., Alafuzoff, I., Koistinaho, J. and Pirttila, T. (2002) Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain. *Electrophoresis* **23**, 3428-3433.
25. Abdul, H. M., Wenk, G. L., Gramling, M., Hauss-Wegrzyniak, B., and Butterfield, D. A. (2004) APP

and PS-1 mutations induce brain oxidative stress independent of dietary cholesterol: implications for Alzheimer' s disease. *J. Neurochem.* **74**, 2520-2527.

26. Kim, H., Eliuk, S., Deshane, J., Barnes, S., and Meleth, S. (2005) Nutriproteomics approach to understanding dementia-relevant brain protein changes in response to grape seed extract, a dietary anti-oxidant, in *Oxidative Stress and Age-related Neurodegeneration* (Luo, Y. and Packer, L., eds). CRC, Boca Raton, FL: Chapter 26.
27. Aksenov, M., Aksenova, M., Butterfield, D. A., and Markesbery, W. R. (2000) Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer' s disease brain. *J. Neurochem.* **74**, 2520-2527.
28. Decker, L. A., ed. (1977) *Worthington Enzyme Manual*. Worthington Biochemical, Freehold, NJ.
29. Aslan, M., Ryan, T. M., Townes, T. M., et al. (2003) Nitric oxide dependent generation of reactive species in sickle cell disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 4194-4204.
30. Isom, A., Barnes, S., Wilson, L., et al. (2004) Modification of cytochrome c by 4-hydroxy-2-nonenal: evidence for histidine, lysine and arginine-aldehyde adducts. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1136-1147.
31. Camacho-Carvajal, M. M., Wollscheid, B., Aebersold, R., Steimle, V., and Schamel, W. W. (2004) Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* **3**, 176-182.
32. Culvenor, J. G., Ilaya, N. T., Ryan, M. T., et al. (2004) Characterization of presenilin complexes from mouse and human brain using Blue Native gel electrophoresis reveals high expression in embryonic brain and minimal change in complex mobility with pathogenic presenilin mutations. *Eur. J. Biochem.* **271**, 375-385.
33. Galvani, M., Hamdan, M., Herbert, B., and Righetti, P. G. (2001) Alkylation kinetics of proteins in preparation for two-dimensional maps: a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation. *Electrophoresis* **22**, 2058-2065.
34. Bai, F., Liu, S., and Witzmann, F. A. (2005) A "destreaking" method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine. *Proteomics* **5**, 2043-2047.
35. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass Spectrometry sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.
36. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) Mass Spectrometric identification of proteins from silver stained polyacrylamide gels: method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**, 601-605.
37. Lewis, T. S., Hunt, J. B., Aveline, L. D., Jet al. (2000) Identification of novel MAP kinase pathway signaling targets by functional proteomics and mass spectrometry. *Mol. Cell.* **6**, 1343-1354.
38. Unlu, M., Morgan., M. E., and Minden, J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.
39. Friedman, D. B., Hill, S., Keller, J. W., et al. (2004) Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 793-811.
40. Lilley, K. and Friedman, D. B. (2004) All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D gel proteomics. Expert Rev. *Proteomics* **1**, 1-9.

第25章 衰老与热量限制研究中的代谢组学

Metabolomics in the Study of Aging and Caloric Restriction

Bruce S. Kristal，Yevgeniya I. Shurubor，Rima Kaddurah-Daouk，Wayne R. Matson

摘要 代谢组学能够对生物样品（如血清和血浆）中的小分子进行系统的、理论性的全面研究，和其他“组学”方法相结合，为衰老与热量限制研究提供了一个新的窗口。本章中，我们应用高效液相色谱分离偶联库伦电极阵列检测的方法探测衰老和热量限制动物的代谢组。该系统具有高灵敏度和定量精度的独特优势，但也存在一些缺陷，如对关心的代谢产物结构的信息获取较少，放大能力有限。另外，该系统只能检测具有氧化还原活性的化合物。这一特点是优势还是弊端取决于实验目的和设计。

关键词 HPLC；库伦电极；代谢组学；衰老；热量限制；饮食限制；血清；血浆；脑脊液；线粒体

25.1 引言

代谢组学可以大致描述为一种数据驱动的方法，在“组学”水平上进行生化研究。这种方法首先同时测量系统中尽可能多的代谢产物，最后通过采集到的大规模数据集了解生物系统。与生物学中其他“组学”方法（如基因组学、转录组学及蛋白质组学）类似，代谢组学也有其优势，与其他方法相比更加广泛、全面、公正。因此，组学方法往往会指向意想不到的方向，并让现象更完整地展现出来。组学方法的缺点在于表观的或实际上缺乏假设，以及由数据集的规模和分析这些数据集的统计和信息学方法的固有局限性导致的假阳性和假阴性结果。为了捕获成百上千种代谢产物的信息而进行的技术优化，以及为了聚焦于单个代谢物而进行的分析方法优化造成固有的分析局限性（如偏差、精度丧失、灵敏度下降以及信噪比），也会导致假阳性和假阴性结果。主要分析方法包括核磁共振（NMR）、质谱（*1*，*2*）以及本文介绍的基于高效液相色谱（HPLC）的分离与基于库伦电极阵列的检测偶联。实际上，如今有多种技术方法能够分析各式各样的代谢产物，也有多种信息学[①]方法从生成的大量数据中找出意义。随着代谢组学成

---

① 与生物学中其他组学（如基因组学、转录组学及蛋白质组学）一样，分析方法会生成很大规模的数据集，严重妨碍了独立理解（如人类理解）与经典统计方法的运用。因此，在研究设计阶段就需要仔细考虑处理这些大型数据集的方法。在代谢组学界，方法涵盖聚类、基于构件以及机器学习和系统生物学。代谢组学涉及的信息学问题很复杂，而且不断出现。研究人员通常需要查阅所关注的特定领域的最新科学论文以获得指导。这一领域的问题也可以直接写信询问本文作者 Bruce S. Kristal。

为热门的研究领域，分析仪器和信息学方法得到迅速发展与改进。本章中我们将在介绍其在衰老相关研究中的效用之后，举一个这种方法的例子。

特别地，我们在衰老和热量限制（CR）研究中的至少 4 个大方面中都看到了代谢组学可能的作用。这 4 个方面是：①分类；②假设的生成；③机制的确定；④临床实践。接下来的各部分就这几个方面分别讨论。

25.1.1　分类问题

历史上，衰老和 CR 的研究最初是一门观察和分类的科学。考虑以下陈述：

这是衰老的表型……

这个生物寿命长，这个生物寿命短……

这个生物随意进食，这个动物接受热量限制……

第一句暗示对衰老表型的描述依赖于研究人员在研究衰老的表型之前对“衰老”与“年轻”的界定的准确性。更具体地说，我们注意到对衰老和年轻的“描述”和“分类”是：①成为先验；②实验者认为是明显的、决定性的；③使用研究者认为客观的、非自我参照、广泛接受的特征（如实际年龄）。考虑到这 3 点，这种分类显然在一些领域诸如衰老相关研究中有局限性。在这些领域中，问题与答案不再黑白分明（例如，衰老与年轻的界线究竟是什么）。

第二句中，实验者必须做出独断或比较，这种比较或者主要适用于特定的比较，或者就定义而言就有自我参照性。因此，虽然这种分类能够有力支持一系列确定的实验，但由于其可移植性差，应用往往非常有限。

第三句中，划分似乎基于实验事实（饮食饲喂和动物），但当其应用在外部系统（如当最初研究在另一个具有不同饮食模式的品系中进行，最初比较基于大鼠或特定的小鼠品系时，人类就是一个外部系统）中，或者处理方法产生了预期之外的不同效果（如对一种动物品系的限制没有好处，或过度限制而产生毒性）时，区分就变得不那么明显。

从这些例子能够合理地预见，代谢“快照”可以提供分类单个生物体的客观标准。此外，每种条件、考虑或质疑下都可以根据所关心问题的目的和明确标准建立各自不同的分类。考虑到代谢组学的潜在敏感性，这一技术提供这个生物体状态的信息。例如，尿液、脑脊液（CSF）和血清都是机体代谢产物的采集点，将会是解决分类问题的强大方法。与这一观点相一致的是，我们已经在 FBFN1（Fischer X Brown Norway F1）大鼠中成功确定了 CR 的生物标志物（***3-8***）。

25.1.2　假设的生成问题

总体上讲，衰老相关的研究并不缺乏假设，然而这一领域在设计用来验证主要假设的清晰确定的试验方面能力有限。例如，在技术和认识足够发达，足以开展批判性验证或拒绝这些理论的核心方面的研究之前，存活率假说（最初由 Pearl 在 1928 年提出）（***9***）和衰老的自由基理论（最初由 Harman 在 1956 年提出）（***10***）已经流行了 40～60 年。即使在今天，这些理论的复杂性以及在控制每个变量或探测每个系统的固有的有限

能力导致许多研究人员不愿意放弃这些至少做出过一些有用预测的理论［包括本章作者之一（Bruce S. Kristal）对自由基理论的态度］。除此之外，衰老相关研究的许多领域缺乏足够的信息以产生有用的、可验证的假设。组学技术，包括转录组学、基因组学、蛋白质组学和代谢组学都拥有产生新假设的潜力。

25.1.3 机制问题

实际问题，如费用和样品可用性，通常是试图提出衰老过程相关观察结果内在机制的研究中的主要限制因素。这个问题的一个方面是，在组学之前，一般来说可以一次只提出一个问题，也就是说，研究人员可以仅仅仔细遵循单独一条推理路线（如考察几个蛋白质。mRNA 或代谢产物）。在多种潜在机制都合理时，这些限制就会将许多研究扼杀在萌芽阶段。类似地，由于通常无法返回并以另一种方式考察样本，往往很难处理实验过程中设计或假设的变化。相反，组学水平上的研究本身就会生成一个可以连续再次探测（即再次查询）的电子数据集，用以检测数据是否符合新假设，并在必要时增加验证性试验。

25.1.4 临床实践问题

发达国家的大部分医疗费用都与年龄相关或疾病有关。老年人群深受诸如神经退行性和肿瘤性疾病之苦，这些需要新的治疗方法。因此，代谢组学可能通过促进药物开发，改进药物分配（即个性化药物，药物代谢组学）来提高对这一人群的医疗水平。老年人群也是最难识别出营养缺乏的人群，并且老年人群中最有可能在考虑与药物动力学改变相关的并发症之前，就已经使用多种具有有害相互作用的药物。代谢组学方法最终将确定导致衰老疾病的生化危险因子，并发现减少或消除这些危险因子的方法。因此，老年人群也是最有可能从改进的疾病诊断、预后和发展指标中获益的人群。

当然，以上提出的 4 点仅是代谢组学为衰老和 CR 研究提供的众多潜在机会中的几个例子。其他潜在机会包括比较不同衰老或 CR 模型的数据的能力，以及在相同或更新的模型中快速确定旧的观察结果的能力。

由于篇幅所限和这一系列文章在操作技术层面的关注，本章无法更加全面深入地讲述这一领域的技术和方法。额外背景参见在这一领域中的两本具有影响力的书（***1***，***2***）以及代谢组学会网站（http://www.metabolomicssociety.org）上的一系列实用链接。

本章将介绍我们的基本方法。这种方法自从发表在本系列（***11***）以来变动不大（变动出现在 25.3.1 节，25.3.1 节中 1. 小节，**图 25.2 和图 25.3** 下，另有为可读性而进行的微调），其他部分则与之前的著作和本系列的另一本著作相同（经许可）。

25.2 材料

25.2.1 设备及用品（**注释 1**）

(1) CoulArray（库伦阵列）系统，（ESA Inc.，Chelmsford，MA）：CoulArray 系统包括两个 580 型泵、一个梯度混合器/脉冲阻尼器、一个 PEEK 脉冲阻尼器、一个

540 型自动进样器、柱温箱和一个带有 4 个库伦电极检测器模块（共 16 通道）的CoulArray 检测系统。

（2）两个 TosoHaas TSK-GEL ODS-80™色谱柱串联（4.6 mm×250 mm，5μ 18）**（注释 2）**。

（3）电脑及与系统连接的彩色喷墨打印机。

（4）1 mL 和 200 μL 的可调节移液器。

（5）250 μL 聚丙烯自动采样瓶和盖子。

（6）1.5 mL 玻璃自动采样瓶和盖子。

（7）HPLC 采样管卷边器。

（8）采样瓶托架。

（9）带有冷阱的微量蒸发器。

（10）高速离心机。

（11）通风橱。

25.2.2　试剂

（1）含 0.4%乙酸的乙腈。

（2）甲醇。

（3）异丙醇。

（4）乙腈。

（5）乙酸锂。

（6）冰醋酸。

（7）戊磺酸。

（8）0.85% NaCl 溶液。

（9）蒸馏去离子水。

25.3　方法

25.3.1　样品处理

1. 血浆或血清

（1）血浆或血清样品（250 μL）与 1 mL 预先冷却的含 0.4%乙酸的乙腈混合于 1.5 mL 离心管中。最高速涡旋混合 20 s 后，−4℃，12 000 r/min（11 000 *g*）离心 15 min。将 1 μL 上清液转移到聚丙烯自动采样瓶中并置于微量蒸发器中干燥。初步提取需要在−10℃以下进行。微量蒸发器上的真空必须能够凝结蒸发的样品。将干燥后的残留物溶于 200 μL 流动相 A（后面将要讨论）中，分成 50 μL 的等份，注入 CoulArray 系统。这种方法使反应活性物质，如抗坏血酸、尿黑酸和 6-羟基多巴胺的浓度水平保持在 1 ng/mL。

（2）采集血清或血浆的方法取决于研究组的来源是动物实验还是人类的临床研究。

Matson组目前采用这一方案（Kristal实验室采取相似的方案）。在动物实验中采集血清时，一般在处死动物时用聚丙烯管取血，置于冰上冷却至0～4℃，3000 *g* 离心15 min。小心吸出血清，避免吸出棕黄色的血沉层，因为沉淀在纤维蛋白原凝块中的血小板和白细胞会影响某些信号通路（如5-羟色胺及其代谢产物）的结果。

采集血浆时一般使用真空采血针（Vacutainer™），并加入抗凝血剂。如果临床地点距离离心机和其他仪器较近，则采用以下实验方案。立即将血液在冰上冷却，0～2℃，1500 *g* 离心真空采血针15 min。把含有白细胞和血小板的血浆转移到15 mL的聚丙烯管中，0～2℃，15 000 *g* 离心15 min。接着吸出血浆，使其与血小板和白细胞沉淀分离，分装，－80℃保存。沉淀用0.5 mL生理盐水洗1次后－80℃保存。如果临床地点没有技术支持，用塑料真空采血针采集样品后，置于冰上冷却，0～2℃，8000～9000 *g* 离心20 min。接着立即将样品冷冻于干冰中，然后－80℃保存。实验室收到样品后，将采血针与冷冻柱分离，在－80℃冷却台上分离组分并分装血浆、血沉棕黄层和血红细胞。

总的来说，抗凝血剂的选择以及样品采集和初步处理时的时间-温度工序都是非常重要且复杂的问题，而且尚未完全被理解，最佳方法仍有待发现。实验中遵循一些经验的方法。例如，使用EDTA作为抗凝血剂时，如果不迅速处理样品，则会导致极不稳定的维生素C值。在样品置于冰上约60 min后，维生素C值出现明显的衰减，半水合维生素形成。离心消除了红细胞与血浆的密切接触，减慢维生素C的衰减。使用肝素也会保存维生素C，然而大量肝素会使之后的色谱图中出现假峰，混淆或干扰较晚洗脱出的吲哚类物质。肝素也会降低检测谷胱甘肽、5-羟色胺及其代谢产物和前体的灵敏度。草酸盐对灵敏检测谷胱甘肽有利，但包含3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇（MHPG）的干扰峰和其他在同一时间区域的峰。所有这些影响都依赖于从采集样品到处理样品的时间。这个时间需减到最少，温度控制在2～4℃。实验方案要尽可能标准化。

(3) 在EDTA或肝素存在下，血清中的5-羟色胺代谢物水平的前后一致性较血浆中的差。实质上，需要对任何一种采血方案的特殊效果以及可能对整体模式造成的假象进行分析。自从这一方法发布以来（***11***），我们发表了多篇讨论优化血清代谢组学工作的报告（***12～15***）。

2. 线粒体

(1) 使用标准差速离心技术分离线粒体。分离之后（***11***，***16***），微量离心机离心，弃上清液，沉淀为线粒体样品。如**参考文献 *11*** 中描述，我们发现在160 mmol/L KCl中洗线粒体会去除分离步骤中使用的大部分有机缓冲液。大多数情况下推荐这种洗涤方法，因为使用的缓冲液（如HEPES）有很强的电化学活性，会掩盖色谱图中的成分。

(2) 分析时，在原管内将线粒体沉淀（通常含有2～10 mg蛋白质）重悬于100 μL ddH_2O中，最高速涡旋混合20 s。向样品中加入1 mL含0.4%乙酸的乙腈，再最高速涡旋混合20 s。低温处理样品（置于－80℃预冷却的含有甲醇的托盘内），4档超声处理10 s（超声波细胞粉碎机，Model W-220F，Heat Systems-UltraSonics，Inc）。12 000 r/min（11 000*g*）离心15 min。使用聚丙烯自动采样瓶移去1 mL上清液，在微

量蒸发器中干燥。将剩余的干燥物质溶于 200 μL 流动相 A（稍后讨论）。取 50 μL 加入库伦阵列系统中。

3. 脑脊液

12 000 r/min（11 000 *g*）离心样品 5 min，取 50 μL 加入库伦阵列系统中。

4. 尿液

用 ddH_2O 以 1∶10 的比例稀释尿液样品，直接取 50 μL 样品加入库伦阵列系统中。

25.3.2　HPLC 流动相

1. 流动相 A

（1）流动相 A 储备液配制：称取 399.98 g 戊磺酸，加入 1 300 mL ddH_2O，使用 GF/F 滤纸过滤，再使用 0.2 μm 尼龙滤器过滤。加入 200 mL 冰醋酸，再加入 ddH_2O 至 2 L。1000 mV 电压电解 12～24h，原本污染的浓缩磺酸储备液在阴阳两极分别为热解石墨和［αPd（H）］，在氮气脱氧保护后变得清洁。储备液清洁之后，将电势差调为 −50 mV，电解 1～2 h，使溶液的氧化电位（pE）稳定在负值。这利于易被氧化的化合物（如尿黑酸）在缓冲液中的稳定性。

（2）工作流动相 A 的配制：稀释 50 mL 流动相 A 储备液至最终体积为 1 L。加入 1 mg/L柠檬酸。使用 0.2 μm 尼龙滤器过滤。最终流动相的 pH 为 3.02。

2. 流动相 B

（1）工作流动相 B 的配制：混合 8 L 甲醇，1 L 异丙醇，1 L 乙腈，100 mL 4 mol/L 乙酸锂，pH 4.1（稍后讨论），200 mL 冰醋酸，柠檬酸 10 mg/L。使用 0.2 μm 尼龙滤器过滤。

（2）乙酸锂溶液（4 mol/L）：向 1760 mL 冰醋酸中加入 672 g LiOH，冰浴，混合均匀。再加入 880 mL 冰醋酸，加入 400 mL ddH_2O。用冰醋酸或 2 mol/L LiOH 调节 pH，最终用 ddH_2O 以 1∶20 比例稀释后的 pH 为 4.10（通常 pH 改变 0.05 需要 200 μL乙酸或 1 mL 2 mol/L LiOH）。再加入 ddH_2O 至最终体积为 4 L。由于 LiOH 与冰醋酸发生放热反应，注意要小心缓慢地向 LiOH 中加入冰醋酸。使用 GF/F 滤纸过滤。

25.3.3　HPLC 标准

1. 准备与存放

（1）实际中，不同的实验采用不同标准（每套标准适用于 40～80 种化合物）（**5**，**6**）。例如，某套标准适用于测量氧化应激，可能包括如，*o*-、*m*-、*p*-和 *N*-酪氨酸、谷胱甘肽、氧化谷胱甘肽等标志物，而针对神经学研究的标志物可能包括多巴胺、犬尿氨

酸、犬尿喹啉酸和高香草酸。根据不同的情况，这些不同的标准既可以单独使用，也可以结合使用。在优化的条件下，CoulArray 能够分辨任一条件下运行一次色谱所分出的全部 40～80 种化合物。

(2) 目前，一种标准溶液的配制方法如下：取每种标准物质 10～100 mg 置于标记好的 100 mL 带有聚四氟乙烯内衬的盖子的茶色瓶中（Wheaton）。将每种标准物质溶于 100 mL 20%甲醇溶液或 0.85%盐溶液中（依所使用的标准物质的溶解度而定）。用 0.85%盐溶液适当稀释这些标准物质溶液（稀释倍数由分析的样品而定）至最终体积为 1 L。每种标准溶液通常使用 20 μL 至 1 mL。每种标准溶液和分装的标准溶液混合液 －80℃保存在自动采样瓶中，保存时间＞7 年。混合后的标准溶液在使用前 4℃解冻并混合均匀。

2. HPLC 分离与库伦阵列分析

(1) CoulArray 系统允许等度洗脱或梯度洗脱条件下的分析。我们所使用的基本的洗脱方法已经发表（***11***，***16～18***）。简单来说，在 120 min 洗脱过程中，流动相 B 的梯度从 0%增加到 100%，样品依次被洗脱出来。大约在最后的 10 min 进行高电势清洗步骤，并使色谱柱恢复到处于 100%的流动相 A 中。A 流动相中磺酸的清洁作用和 B 流动相中高浓度的有机溶剂使准备样品阶段残余的蛋白质和脂类不存在于色谱柱中。流动相的选择和重复的清洗步骤确保 3～6 个月的连续稳定运行。调节流速以补偿共沸黏度。16 通道库伦阵列检测器用来分析被测物，如**图 25.1** 所示的大鼠血清和大鼠线粒体的色谱图。

(2) 对于多组分模式来说很重要的一点是色谱图能够经过简单地调整与特定单独的应用相适应。调整可能包括在被测物亲水性较好时缩短洗脱曲线（减少运行时间），或延长共同洗脱出来的部分以使峰分开。例如，在一些样品中甲硫氨酸和鸟嘌呤核苷共同洗脱出来。如果这两种物质的峰对研究很重要，就需要调整色谱图以获得想要的改变。

3. 数据分析

(1) 库伦阵列上的 HPLC 分析能够用来产生样品中所有具有氧化还原活性化合物的数据库。在本文提出的色谱参数的情况下，所有亲水性介于维生素 C 和维生素 E 之间，氧化还原电势为 0～900 mV［αPd（H）］的具有氧化还原活性的分子都能够被检测到。分析数据库可以研究感兴趣的特定化合物（如多巴胺）、相关联的化合物（如脂酸、羟基化苯丙氨酸副产物）、整个通路［如嘌呤代谢产物（尿酸、黄嘌呤、次黄嘌呤、黄苷、鸟苷和鸟嘌呤）］或这些物质的组合。此外，使用多变量分析技术（如聚类分析、模式识别等）可以了解代谢模式。所有情况的初始分析都由 CoulArray 套装提供的软件完成。

(2) 基本的 CoulArray Windows 32 软件包（ESA，Inc）能够完成下文所述的所有分析，包括指认峰的定性分析和将峰与绝对或相对标准物比较得出的定量分析。软件中的专有运算法则自动减去梯度漂移产生的背景。软件包括帮助个人进行基本分析的向导。

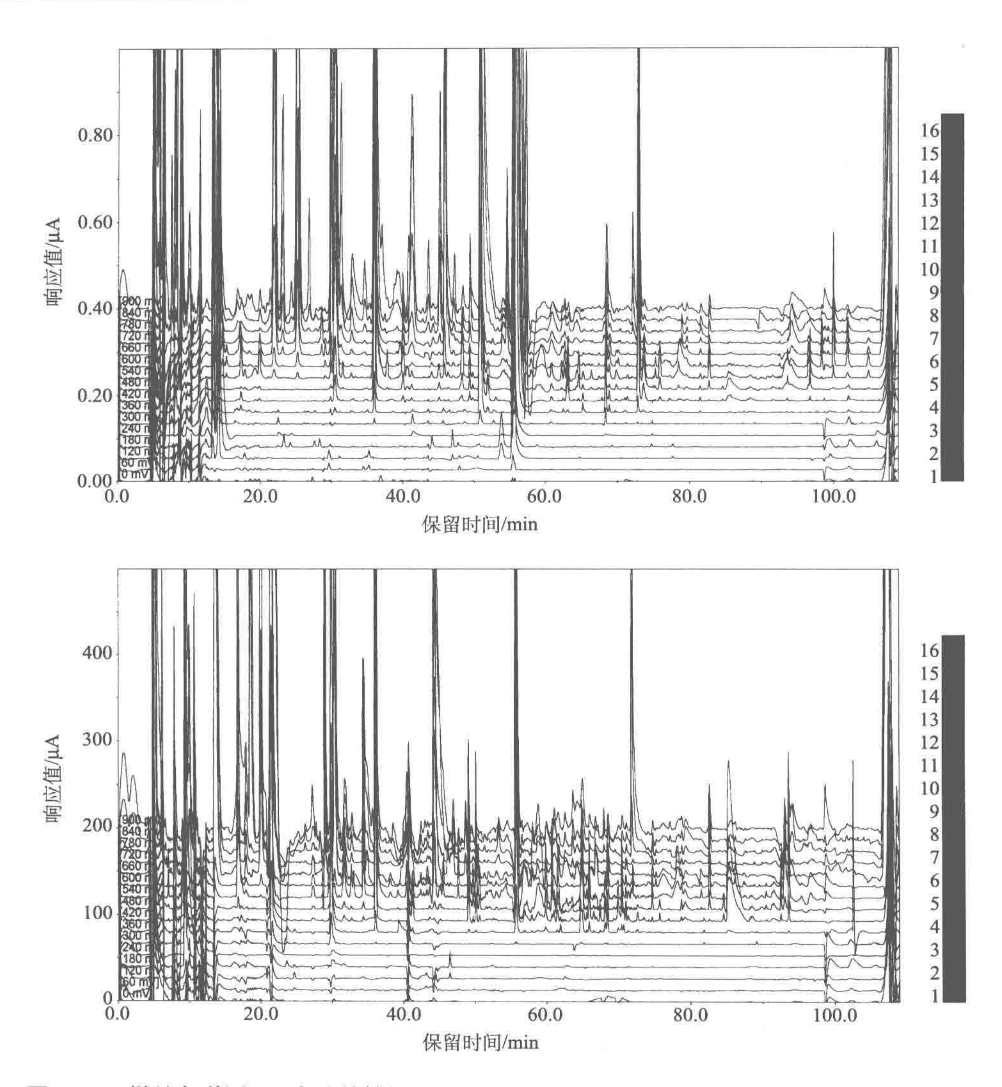


图 25.1　样品色谱图。6 个月龄雄性 Fischer X Brown Norway F1 大鼠血清分析（上图）。4 个月龄雄性 Fischer 344 大鼠肝脏线粒体分析（下图）。该线粒体样品使用蔗糖甘露醇缓冲液由差速离心分离。处理步骤见原文，包括 160 mmol/L KCl 洗涤。上下图的全刻度度分别为 1 μA 和 500 nA。两个色谱图均在运行 120 min 后获得

（3）动态范围使得分析被测物的浓度范围能够达到 5 个数量级甚至更多，即色谱柱上的被测物质量从 1～10 pg 到 1～3 μg。实际操作中，若化合物的量达到了检测上限，可能造成色谱行为和传感器上的电化学响应的改变。在化合物浓度非常高时，会典型地出现信号“溢出”至下一个传感器，从而导致响应比的变化。通过选择控制标样的合适的浓度可以控制这些变化，但样品准备步骤中的回收分离对精度控制的影响更大（对需要这些步骤的样品来说）。

（4）分析复杂混合物中一系列被测物时，首先通过标准物质或一个由样本集的大部

分或全部成分的等份构成的合并样本生成一个化合物表格，接着进行自动分析。

(5) 实际操作中，初始定量需要手动察看以确保软件对被测物色谱峰的正确识别。早期版本的软件在 3 次试运行之后对峰的分析能够达到 95%以上的成功率（尚未在相同条件下测试 Windows 版本）。峰值可以直接转入 Windows 应用程序中（如 Lotus、Excel）。

4. 定性分析

用库伦阵列生成的数据做基本的定性分析基于 3 个标准：保留时间、主要通道、主要通道和次要通道的反应活性之比（***17～22***）。CoulArray 软件自动完成大部分的分析，用户也可以依情况自行调整参数，如放宽或固定标准以解决潜在的矛盾。软件将数据与平行的标准物质运行结果或混合样品中相应的峰进行比较。峰的特性可以通过向样品中加入感兴趣的被测物来进一步研究。

5. 定量分析

(1) 可以使用以下两种方法之一进行定量分析。与已知浓度的特定样品的分析标准比较可以绝对定量感兴趣的特定的已知被测物。分析标准物可以单独进行一次运行或者加入样品副本中。通过我们对血浆、血清、尿液、脑脊液的研究发现一般来说，对样品采用同样的处理方法可以获得同样的回收率（差别在几个百分点以内）。用加入了特定被测物的样品可以对特定的系统进行定量回收（注意不要加入过多［***10***］）。我们的实验室使用标准合并样本中的多种组分来获得变异性，每天运行一次。使用酪氨酸实现标准样品间的归一化（***7***），复杂的柱间变异性也已经精确地得到（***11***）。使用血清、血浆、大脑等组织以及培养细胞的提取物，得到了回收率。这些数据表明，使用本章方法提取的物质中，以这种方式确定的所有化合物的回收率都为 89%～100%。色谱可见的约 1500 种化合物中，大约 1400 种的提取效率都达到了 95%以上。

(2) 未被识别的峰可以通过与标准合并样本比较来量化。这种情况下，合并样本中所有的被测物被指定了特定的值（如 100），接着各样本中的峰与这个标准相比较，进而被量化。

25.3.4　结果

(1) 血清：在 ESA Inc. 完成的血清分析表明，用标准品监测得出的色谱保留时间在 30 天中的变化不超过约 1%。绝对定性通道比响应值变化不超过±20%，在纳入标准品控制后下降到±5%以内。

(2) 线粒体：线粒体的色谱参数曾被发表（***16***，***23***），观察到的数据变异性与血清样本相比略差。我们最初的线粒体研究在 CEAS（CoulArray 的早期版本）上进行，当峰与可靠的标准样品的保留时间差别在±1.2%以内，比例准确度在±16%以内，就可以定性地接受一个峰。本研究中，在一个多月的时间里，标准样品保留时间原始数据的波动在 1.7%之内，参照酪氨酸标准试样后，波动在 1.1%之内。被测物保留时间的平均变异系数（CV）%为 0.35%，主要峰与次要峰的反应活性比例的平均 CV%为 11%。需要注意的是，如上文描述，一些化合物没有被分析。

(3) 应用色谱方法分析血清和线粒体的示例见**图 25.1**。对色谱和试剂参数组合起来的效果的检测如**图 25.2**，使用两个合并样本间隔 3 个月运行，再使用平行样本间隔 4 个月运行。**图 25.3** 显示了使用血液样本中血小板-白细胞比例特异性的标志物来确定样本是否在采样阶段被污染。

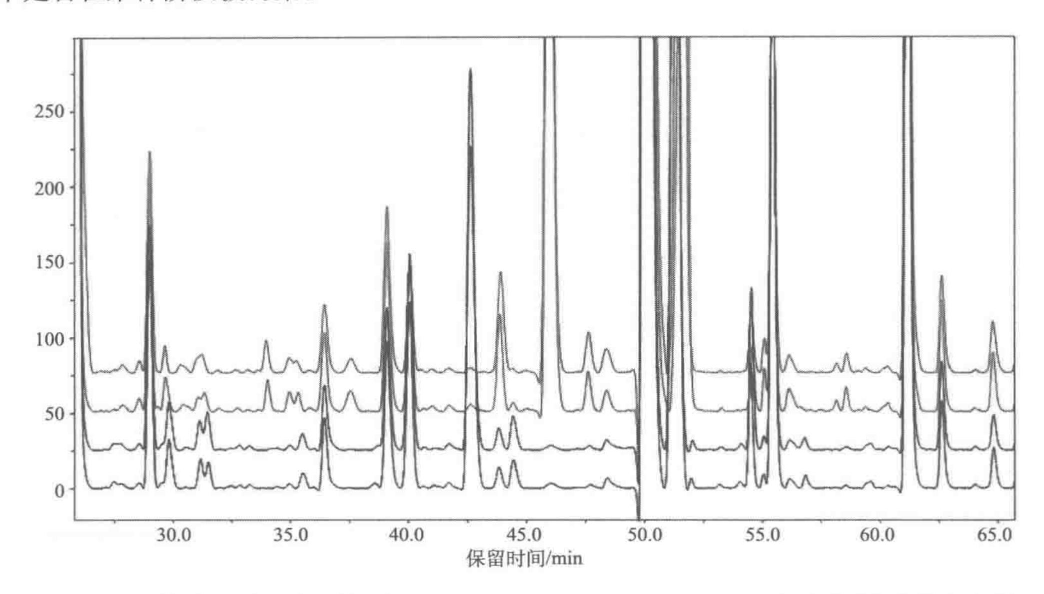


图 25.2　时间归一化。本图使用拉伸软件显示系统的稳定性。下面两条线的样品为帕金森病患者血清，间隔 4 个月运行色谱。上面两条线为间隔 3 个月检测的合并样本色谱图

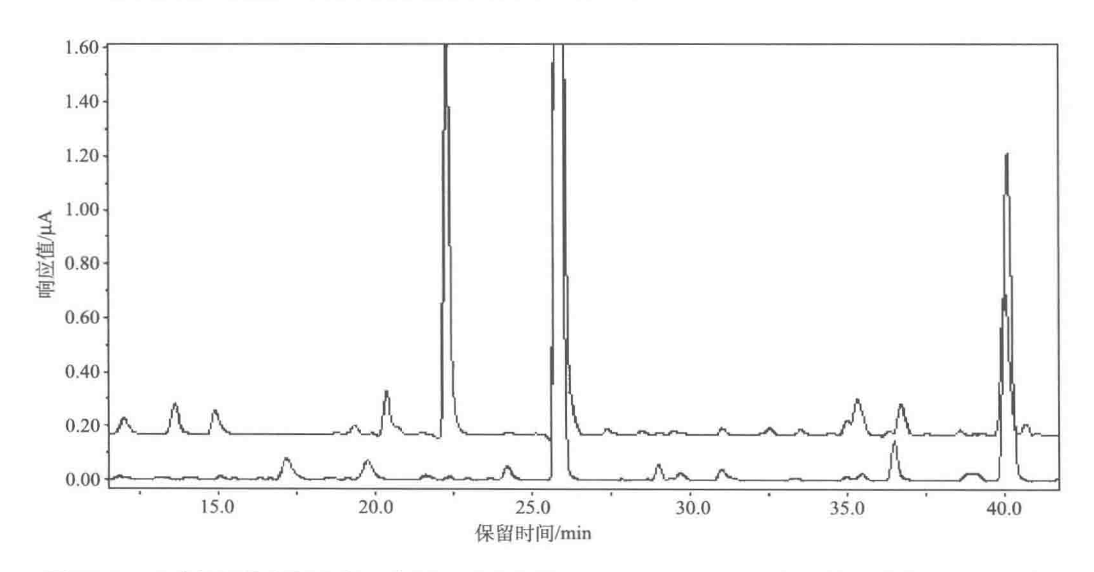


图 25.3　血小板污染的标志物。本图显示确定样品是否被血小板污染的 5 种标志物之一。如果一个样品中有全部 5 种标记物，那么就要从研究中去除这个样品。上面的谱图表示含有血小板的样品，下面的谱图表示无污染的血浆样本。标志物的生化特性尚不清楚。请注意次要峰的不同反映了血液的个体差异

很多情况下，能成功显现并检测的峰所允许的最大值为 1 nA。因此，峰值为满量程 0.1%～0.2%的峰都能够被研究。

两组实验中，阵列的电压定为 0～900 mV，以 60 mV 的增量增加。样品室和柱温稳定在 35℃。2 次色谱使用的准确方法见**表 25.1**。

表 25.1　色谱方法

步骤	时间/min	注释	流动相 B 含量/%	流速/(mL/min)
01	0.00	启动	0	1.00
02	0.10	自动调零		
03	0.56	自动进样（1 s）		
04	1.00	文档开始		
05	30.00	流动	12	1.00
06	35.00	流动	20	1.00
07	55.00	流动	48	0.70
08	90.00	流动	100	0.99
09	95.00	流动	100	1.20
10	100.00	流动	100	1.20
11	100.10	流动	0	1.20
12	104.00	流动	0	1.20
13	107.00	流动	0	1.00
14	110.00	文档结束		
15	110.00	清洗开始		
16	114.00	流动	0	1.00
17	114.50	清洗结束		
18	120.00	流动	0	1.00

25.4　注释

（1）其他必要的仪器和用品包括标准实验室安全用品（手套、护目镜、实验服）、玻璃仪器（包括漏斗）、微量离心机、10 mL 聚丙烯管。另外，如果样品不立即处理或检测，则需要－80℃或液氮储存装置。

（2）之前工作中成功使用的色谱柱包括：META250（4.6 mm×250 mm，5 μ C18）、2 系列MCM（4.6 mm×250 mm，5 μ C18）。

致谢

本研究由 National Institutes on Aging（NIA）R21AG024232（BSK）支持。BSK 拥有与 ESA 公司的非金融咨询/合作协议。WRM 是 ESA 公司的创始人以及前技术总监，并就 National Institutes of Health（NIH）Metabolomics Roadmap Grant“在单个代谢组学平台上整合 LCEC/LCMS”做咨询工作。

参考文献

1. Harrigan, G. G. and Goodacre, R. (2003) *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*. Kluwer, Boston/Dordrecht/London.
2. Vaidyanathan, S., Harrigan, G. G., and Goodacre, R. (2005) *Metabolome Analysis: Strategies for Systems Biology*. Springer, New York.
3. Vigneau-Callahan, K. E., Shestopalov, A. I., Milbury, P. E., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2001) Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: analytical and biological variability issues in rats. *J. Nutr.* 924S-932S.
4. Shi, H., Vigneau-Callahan, K. E., Shestopalov, A. I., Milbury, P. E., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2002) Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: Proof of principle in female and male rats. *J. Nutr.* **132**, 1031-1038.
5. Shi, H., Vigneau-Callahan, K. E., Shestopalov, A. I., Milbury, P. E., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2002) Characterization of diet-dependent metabolic serotypes: Primary validation of male and female serotypes in independent cohorts of rats. *J. Nutr.* **132**, 1039-1046.
6. Paolucci, U., Vigneau-Callahan, K. E., Shi, H., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2004) Development of biomarkers based on diet-dependent metabolic serotypes: characteristics of component-based models of metabolic serotypes. *OMICS* **8**, 221-238.
7. Paolucci, U., Vigneau-Callahan, K. E., Shi, H., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2004) Development of biomarkers based on diet-dependent metabolic serotypes: concerns and approaches for cohort and gender issues in serum metabolome studies. *OMICS* **8**, 209-220.
8. Shi, H., Paolucci, U., Vigneau-Callahan, K. E., Milbury, P. E., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2004) Development of biomarkers based on diet-dependent metabolic serotypes: practical issues in development of expert system-based classification models in metabolomic studies. *OMICS* **8**, 197-208.
9. Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300.
10. Pearl, R. (1928) *The Rate of Living*. University of London Press, London.
11. Kristal, B. S., Vigneau-Callahan, K. E., and Matson, W. R. (2002) Simultaneous analysis of multiple redox-active metabolites from biological matrices, in *Methods in Molecular Biology*, *vol.* 186: *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols*. Humana, Totowa, NJ: pp. 185-194.
12. Shurubor, Y., Matson, W. R., Martin, R. J., and Kristal, B. S. (2005) Relative contribution of specific sources of systematic errors and analytical imprecision to metabolite analysis by HPLC-ECD. *Metabolomics* **1**, 159-168.
13. Shurubor, Y. I., Paolucci, U., Krasnikov, B. F., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2005) Analytical precision, biological variation, and mathematical normalization in high data density metabolomics. *Metabolomics* 1, 75-85.
14. Shi, H., Vigneau-Callahan, K. E., Matson, W. R., and Kristal, B. S. (2002) Attention to relative response across sequential electrodes improves quantitation of coulometric array. *Anal. Biochem.* **302**, 239-245.
15. Kristal, B. S., Shurubor, Y., Paolucci, U., and Matson, W. R. (2005) Methodological issues and experimental design considerations to facilitate development of robust, metabolic profile-based classification, in *Metabolic Profiling: Its Role in Drug Discovery and Integration with Genomics and Proteomics* (Harrigan, G., Goodacre, R., and Vaidyanathan S., eds). Springer, Boston: pp. 173-194.
16. Kristal, B. S., Vigneau-Callahan, K. E., and Matson, W. R. (1999) Purine catabolism: links to mitochondrial respiration and antioxidant defenses? *Arch. Biochem. Biophys.* **370**, 22-33.
17. Milbury, P. E., Vaughan, M. R., Farley, S., Matula, G. J., Jr., Convertino, V. A., and Matson, W. R. (1998) A comparative bear model for immobility-induced osteopenia. *Ursus* **10**, 507-520.

18. Milbury, P. E. (1997) CEAS generation of large multiparameter databases for determining categorical process involvement of biomolecules, in *Coulometric Array Detectors for HPLC*. International Science, Utrecht, The Netherlands: pp. 125-141.

19. Acworth, I. N., Naoi, M., Parvez, H., and Parvez, S., eds. (1997) *Coulometric Electrode Array Detectors for the HPLC*. Utrecht, VSP International Science Publication.

20. Svenosen, C. N. (1993) Multi-electrode detectors in high performance liquid chromatography: a new dimension in electrochemical analysis. *Analyst* **118**, 123-129.

21. Matson, W. R., Langials, P., Volicer, L., Gamache, P. H., Bird, E. D., Mark, K. A. (1984) n-electrode three dimensional liquid chromatography with electrochemical detection for determination of neurotransmitters. *Clin. Chem.* **30**, 1477-1488.

22. Acworth, I. N. and Gamache, P. H. (1996) The coulometric electrode array for use in HPLC analysis, part 1: theory. *Amer. Lab.* **5**, 33-37.

23. Kristal, B. S., Vigneau-Callahan, K. E., and Matson, W. R. (1998) Simultaneous analysis of the majority of low-molecular weight, redox-active compounds from mitochondria, *Anal. Biochem.* **263**, 18-25.

索　引

生命科学实验指南系列 · 典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号


ISBN 978-7-03-047486-5

定价（全套）：4500.00元

[General Information]
书名=生物衰老 研究方法与实验方案
作者=（美）托尔夫波T.O.著
页数=317
SS号=14076113
DX号=
出版日期=2016.07
出版社=北京科学出版社